



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche
Sezione di Anatomia e Istologia

Dottorato di Ricerca in
Fisiopatologia Metabolica Congenita

CICLO XX

METABOLISMO LIPIDICO NEL FEGATO: APPROCCIO
IMMUNOCITOCHIMICO IN UN MAMMIFERO IBERNANTE

S.S.D. BIO/16

Coordinatore:
Prof. ANDREA SBARBATI

Tutor:
Prof. CARLO ZANCANARO

Dottoranda:
Dott.ssa ANNA SUOZZI

28 febbraio 2008

Scopo della tesi e piano di lavoro.....	4
Introduzione	5
Enzimi	5
Acido grasso sintetasi (FAS).....	5
Acil Co A sintetasi per acidi grassi a catena lunga (ACSL-1)	8
Andamento del metabolismo lipidico e glucidico durante il ciclo annuale	9
Ibernazione e ibernanti	12
Caratteristiche generali dell'ibernazione.....	12
Energia	13
Modificazioni cellulari e tissutali durante l'ibernazione	14
Il Fegato.....	16
Immunocitochimica ultrastrutturale	17
Materiali e Metodi.....	19
Raccolta campioni	19
Processazione dei tessuti	19
Processazione per il controllo morfologico.....	19
Processazione per l'analisi immunocitochimica	21
Immunocitochimica.....	22
Anticorpi.....	22
Protocollo	22
Condizioni e variabili testate.....	23
Analisi semi-quantitativa.....	23
Risultati	25
Controllo morfologico.....	25

Distribuzione intracellulare della marcatura	25
Acido grasso sintetasi (FAS):.....	25
Acil Co A sintetasi per acidi grassi a catena lunga (ACSL-1):.....	25
Valutazione quantitativa della marcatura.....	25
Discussione e Conclusioni	38
FAS	40
ACSL-1	41
References	Error! Bookmark not defined.

Scopo della tesi e piano di lavoro

Lo scopo di questa tesi è quello di studiare l'espressione di alcuni enzimi del metabolismo lipidico in cellule epatiche di un mammifero ibernante, il moscardino (*Muscardinus avellanarius*), nelle diverse fasi del ciclo annuale.

Infatti il metabolismo lipidico subisce profonde modificazioni nel corso del ciclo annuale dell'animale ibernante (fase di attività, fase di ibernazione e fase di risveglio primaverile) e questo potrebbe essere associato a variazioni nella espressione o nell'attività di enzimi.

In particolare per questa ricerca abbiamo focalizzato la nostra attenzione su due enzimi chiave della via di sintesi e del catabolismo degli acidi grassi:

- Acido grasso sintetasi (FAS)
- Acil CoA sintetasi (ACSL-1)

La loro espressione è stata analizzata nel fegato per il ruolo critico giocato da questo organo nel metabolismo dei lipidi.

L'espressione di questi enzimi è stata studiata tramite immunolocalizzazione ultrastrutturale, tecnica che permette una visualizzazione ad alta risoluzione dei compartimenti cellulari associata con la localizzazione di molecole funzionali nei compartimenti stessi.

In particolare il lavoro si è svolto nei seguenti step sperimentali:

- Valutazione della qualità morfologica dei campioni di fegato prelevati da moscardino ed inclusi in resina per la microscopia elettronica
- Messa a punto del protocollo immunocitochimico per la rivelazione dei due enzimi scelti
- Marcatura immunocitochimica dei due enzimi in moscardini nelle tre fasi del ciclo annuale con valutazione della distribuzione della marcatura nei diversi compartimenti cellulari
- Analisi semi-quantitativa della densità di marcatura dei due enzimi nelle tre diverse fasi del ciclo annuale e analisi statistica della densità di marcatura osservata

Introduzione

Enzimi

Acido grasso sintetasi (FAS)

Gli acidi grassi possono avere diversi ruoli nella cellula. Essi sono la forma principale di conservazione dell'energia nella maggior parte degli organismi viventi e allo stesso tempo sono i principali costituenti delle membrane cellulari.

La biosintesi e la degradazione degli acidi grassi sono via diverse, catalizzate da una serie di enzimi diversi e sono localizzate in compartimenti cellulari diversi.

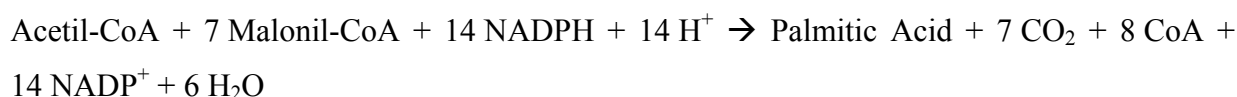
La sequenza di reazioni che porta alla costruzione della lunga catena carboniosa degli acidi grassi è costituita da quattro tappe. Tutte le reazioni del processo biosintetico sono catalizzate da un unico complesso multienzimatico citoplasmatico, chiamato acido grasso sintetasi (FAS) (Lehninger, 1987).

L'acido grasso sintetasi è costituita da due catene polipeptidiche multifunzionali, contenenti ciascuna sette domini funzionalmente separati, giustapposti testa-coda in modo tale che all'interfaccia delle due sub-unità si formino due centri separati per l'assemblaggio degli acidi grassi (Smith, 1994). Uno dei vantaggi di avere l'intero processo in una singola proteina multifunzionale risiede nel fatto che gli intermedi possono essere prontamente trasferiti senza essere liberati.

In condizioni normali, il FAS è espresso nei tessuti lipogenici, quali il fegato e il tessuto adiposo; altri tessuti presentano basse attività di questo enzima.

L'acido grasso sintetasi (FAS) catalizza la sintesi di acidi grassi di lunghezza massima di 16 atomi di carbonio usando acetil-CoA come primer, malonil-CoA come donatore di due atomi di carbonio e NADPH come agente riducente (Kusakabe et al., 2000). Questa reazione viene ripetuta ciclicamente per sette volte fino alla formazione di acido palmitico (acido grasso saturo, C16) (Ves-Losada and Brenner, 1996).

La reazione complessiva della sintesi dell'acido palmitico da acetil-CoA è:

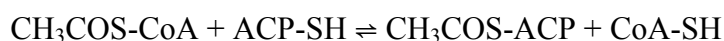


Questa reazione consiste nell'elongazione del gruppo acetile attraverso unita' bicarboniose derivate dal malonil-CoA in un processo sequenziale. L'iniziale formazione irreversibile di malonil-CoA da acetil-CoA e' catalizzata dall'acetil-CoA carbossilasi.

Nella sintesi dell'acido palmitico, operata dal FAS intervengono i seguenti enzimi e reazioni:

ACP = proteina che trasporta gli acili

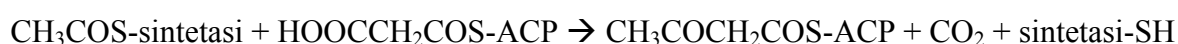
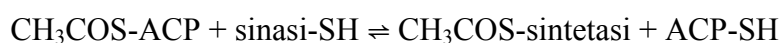
Acetil-transacetilasi



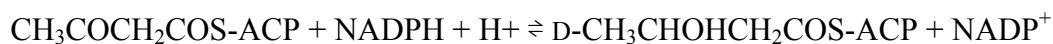
Malonil transacetilasi



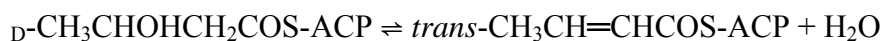
β-chetoacil sintetasi



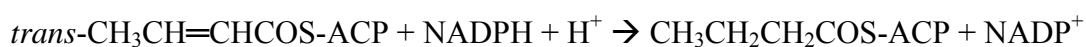
β-chetoacil-reduttasi



β-idrossiacil-deidratasi



Enoil reduttasi



Tioesterasi

$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{COS-ACP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{COOH} + \text{CoA-SH}$
(Wakil, 1989)

In tutti gli organismi queste reazioni sono essenzialmente le stesse.

Questa via può essere meglio visualizzata come un processo ciclico in cui il *primer* acetilico subisce una serie di condensazioni decarbossilative con sette molecole di malonile. Ciascuna reazione di condensazione genera una molecola chetoacilica che subisce gli stessi tre passaggi di riduzione del gruppo chetonico per dare un acil- molecola più lunga di due atomi di carbonio rispetto al ciclo precedente. Alla fine, al completamento di sette cicli di elongazione e riduzione, il prodotto finale è un acido grasso saturo a 16 atomi di carbonio, l'acido palmitico (Smith, 1994).

La sintesi degli acidi grassi avviene principalmente quando c'è un sufficiente o eccessivo apporto di energia che proviene da fonti diverse dagli acidi grassi stessi, e viene conservato sotto forma di lipidi, cioè triacilgliceroli, poiché sarebbe energeticamente dispendioso sintetizzare e rapidamente degradare gli acidi grassi.

La reazione catalizzata dall'acetil-CoA carbossilasi è la tappa che limita la velocità della biosintesi degli acidi grassi, e questo enzima è un rilevante sito di regolazione metabolica. Il palmitil-CoA, principale prodotto della biosintesi degli acidi grassi, si comporta come inibitore retroattivo di questo enzima e il citrato è invece il suo attivatore allosterico. Il citrato, esportato dai mitocondri quando acetil-CoA e ATP aumentano, è il precursore dell'acetyl-CoA citosolico necessario per la sintesi degli acidi grassi. L'acetil-CoA carbossilasi è inibita anche da modificazioni covalenti, (fosforilazione da parte di glucagone e adrenalina) (Lehninger, 1987).

La β -ossidazione viene bloccata dal malonil-CoA, che inibisce la carnitina aciltransferasi I. Quindi, durante la sintesi degli acidi grassi la produzione del primo intermedio, il malonil-CoA, inibisce la β -ossidazione a livello del sistema di trasporto degli acili presente nella membrana mitocondriale interna.

Contrariamente all'acetyl-CoA carbossilasi, il FAS non è soggetto a regolazione allosterica e a modificazioni post-trascrizionali. Il FAS è regolato principalmente attraverso il controllo della sua trascrizione.

E' stato dimostrato che elevati livelli plasmatici di insulina, in una dieta ricca di carboidrati, o di ormoni tiroidei inducono gli enzimi coinvolti nella sintesi degli acidi grassi e in particolare stimolano l'espressione del FAS.

Al contrario, il glucagone, elevato durante il digiuno, inibisce queste attivita' enzimatiche. Anche i glucocorticoidi regolano, aumentando l'espressione del gene del FAS (Sul and Wang, 1998).

Gli acidi grassi stessi hanno anche una funzione di regolazione della espressione genica. In particolare il FAS e' regolato negativamente dagli acidi grassi polinsaturi (PUFA), secondo un meccanismo ancora ampiamente sconosciuto (Duplus and Forest, 2002).

In commercio sono disponibili anticorpi che danno garanzia di specificita' e riproducibilita' diretti contro il FAS umano che hanno una cross reattivita' con altre specie tra cui i roditori e sono testati in microscopia ottica.

Acil Co A sintetasi per acidi grassi a catena lunga (ACSL-1)

La prima reazione nel metabolismo degli acidi grassi nei mammiferi richiede l'attivazione dell'acido grasso tramite il legame dell'acido grasso stesso con il coenzima A (CoA). Questa reazione e' catalizzata dall'acil Co A sintetasi. La regolazione dell' ACSL-1 e' importante per il metabolismo degli acidi grassi perche' questo enzima ne catalizza la reazione iniziale (Suzuki et al., 1990).

La reazione in cui gli acidi grassi vengono legati al CoA avviene in due fasi (Mashek et al., 2004):

acido grasso + ATP \rightarrow acil adenilato + pirofosfato

acil adenilato + CoA \rightarrow acil-CoA + AMP

Esistono tre diverse acil Co A sintetasi, specifiche per una data lunghezza della catena dell'acido grasso. In particolare l'ACSL e' specifica per acidi grassi a lunga catena (con 12-22 atomi di carbonio) (Lehninger, 1987).

L'acil Co A sintetasi per acidi grassi a catena lunga (ACSL-1) è descritto in molti tessuti, ma la sua più elevata attività è nel fegato (Ves-Losada and Brenner, 1996).

Nei mammiferi sono state identificate e caratterizzate cinque isoforme di ACSL-1 prodotte da geni separati. Sebbene le singole isoforme differiscano tra loro per il substrato di preferenza, la cinetica enzimatica, la localizzazione cellulare e tissutale, il significato della loro diversità non è chiaro (Li et al., 2006). Nel fegato di ratto, ACSL-1 è localizzata nei microsomi, sulla membrana mitocondriale esterna e sulle membrane dei peroxisomi. L'ACSL-1 estratta da microsomi, mitocondri e peroxisomi da fegato di ratto sono identiche per quanto riguarda proprietà molecolari e catalitiche, specificità di substrato e proprietà cinetiche. Questa identità è stata confermata anche immunologicamente (Suzuki et al., 1990). Ci sono inoltre evidenze che l'ACSL-1 abbia anche funzioni regolatorie, modulando l'espressione genica (Black et al., 2000). In particolare è stata dimostrata attività ACSL-1 nel nucleo di cellule epatiche di ratto. Questo implica che gli acidi grassi a lunga catena possono essere attivati nel nucleo per essere ulteriormente metabolizzati in questo compartimento in processi come desaturazione e elongazione degli acidi grassi, acilazione a glicerolipidi e sfingolipidi e esterificazione del colesterolo (Ves-Losada and Brenner, 1996). È stato infatti dimostrato che gli acidi grassi hanno un effetto significativo sulla quantità di RNA di geni che codificano proteine coinvolte nel metabolismo degli acidi grassi nei mammiferi. In generale, gli acidi grassi sopprimono gli enzimi per la sintesi degli acidi grassi stessi, tra cui l'acetil CoA carbossilasi, l'acido grasso sintetasi, e aumentano l'espressione di geni coinvolti nella biogenesi dei perossisomi, nella β -ossidazione e di alcune proteine di trasporto degli acidi grassi (Black et al., 2000).

In commercio sono disponibili anticorpi che danno garanzia di specificità e riproducibilità diretti contro l'ACSL-1 umano, hanno una cross reattività con altre specie tra cui i roditori e sono stati testati in microscopia ottica.

Andamento del metabolismo lipidico e glucidico durante il ciclo annuale

Le concentrazioni plasmatiche di uno specifico substrato metabolico indicano qual è il suo ruolo, in quel momento, per l'ossidazione cellulare durante il ciclo annuale.

Nell'animale non a digiuno, il glucosio è la principale fonte di energia. Ma in assenza di consumo di cibo, il glicogeno epatico e muscolare rappresenta l'unica fonte di glucosio, oltre al glucosio prodotto attraverso la gluconeogenesi. Essendo le scorte di glicogeno limitate e la gluconeogenesi a partire dal glicerolo insufficiente, se il glucosio fosse il principale combustibile metabolico, la gluconeogenesi a partire dagli aminoacidi causerebbe un'intensa riduzione della massa muscolare.

Nonostante il fatto che durante l'ibernazione ci sia un aumento di gluconeogenesi a partire dagli aminoacidi (Burlington and Klain, 1967), ci sono scarse evidenze di una riduzione della massa muscolare durante l'ibernazione (John, 2005). È quindi plausibile che durante l'ibernazione la maggior fonte di energia sia rappresentata da un substrato non glucidico.

Nello scoiattolo e nella marmotta le concentrazioni plasmatiche di glucosio rimangono stabili a livelli invariati o elevati durante tutto il periodo dell'ibernazione (Florant et al., 1986; Krilowicz, 1985; Nizielski et al., 1989). Mentre nel riccio e nel ghio, le concentrazioni di glucosio rimangono stabili ma a livelli leggermente ridotti (Castex et al., 1984). Inoltre la somministrazione di glucosio radiomarcato evidenzia che durante l'ibernazione c'è una soppressione dell'incorporazione di glucosio radio marcato nella CO₂ e le concentrazioni plasmatiche di lattato sono conseguentemente ridotte. In effetti le riserve di glicogeno possono addirittura aumentare durante il torpore profondo suggerendo che le scorte di glicogeno vengono preservate per un loro possibile ruolo critico durante il risveglio (John, 2005).

Questa osservazione è supportata dal fatto che alcune attività enzimatiche critiche della glicolisi (es. piruvato deidrogenasi, piruvato fosfofruttochinasi) sembrano essere sopresse durante l'ibernazione (Brooks and Storey, 1992; Buck et al., 2002). L'inibizione dell'attività glicolitica è comunque reversibile come dimostrato dall'aumento dell'ossidazione dei carboidrati durante il torpore profondo se l'animale è stimolato (Buck and Barnes, 2000).

Il fatto che la maggior parte degli ibernanti deposita considerevoli quantità di grassi durante la fase estiva di aumento della massa corporea e il fatto che questi grassi sono successivamente persi durante la fase di ibernazione è la principale evidenza che le scorte di lipidi siano il principale combustibile durante l'ibernazione. Ciò nonostante questo non risulta evidente dalle concentrazioni plasmatiche di acidi grassi durante l'ibernazione, che nello scoiattolo sembrano non differire dai valori della fase di eutermia (Krilowicz, 1985; Nizielski et al., 1989), ma nel riccio durante l'ibernazione sono ridotte (John, 2005). Al contrario, le concentrazioni di triacilglicerolo sono marcatamente ridotte durante il torpore profondo (Nizielski et al., 1989).

La conclusione di quanto detto è che i lipidi sono il principale substrato energetico durante l'ibernazione.

Ulteriori prove del fatto che l'ossidazione degli acidi grassi sia la fonte quasi esclusiva di energia vengono dal Quoziente di Respirazione (QR) calcolato da misure di consumo di ossigeno e di produzione di CO₂ durante l'ibernazione. In generale, i valori del QR variano da 0.7, che rappresenta quasi il 100% di ossidazione degli acidi grassi, a 0.1, che rappresenta quasi il 100% di ossidazione dei carboidrati. Durante il torpore profondo valori di QR di quasi 0.7 sono indicativi di una quasi esclusiva ossidazione degli acidi grassi (John, 2005). In conclusione il se pur limitato metabolismo durante il torpore profondo è sostenuto dall'ossidazione degli acidi grassi.

Un requisito indispensabile dell'ibernazione è che l'animale deve essere capace di tornare all'eutermia. I mammiferi ibernanti si risvegliano non solo in primavera ma anche periodicamente durante il periodo di ibernazione. La durata dell'ibernazione prima di un risveglio periodico varia con regolarità da diversi giorni a diverse settimane (John, 2005), e anche la durata dell'eutermia è breve, tipicamente meno di 24 ore (Carey et al., 2003; Geiser, 2004). I risvegli periodici sono energeticamente dispendiosi; circa l'85-90% dell'energia disponibile durante il periodo di ibernazione è speso per sostenere questi periodici ritorni all'eutermia (John, 2005). Poiché il riscaldamento è così energeticamente dispendioso, i frequenti risvegli periodici dall'ibernazione sono apparentemente contraddittori, ma suggeriscono che il loro verificarsi sia indispensabile. Presumibilmente, ci sono processi o funzioni che devono essere periodicamente riportati a temperature eutermiche per la sopravvivenza dell'organismo.

È interessante che il consumo di O₂ e la produzione di CO₂ durante le fasi precoci del risveglio mostrano uno shift nel QR e un drastico shift nel substrato usato. Durante l'iniziale fase di risveglio fino a che la temperatura corporea raggiunge circa i 12-16°C, il QR aumenta fino quasi a 1, indicando che i carboidrati rappresentano il principale substrato per l'ossidazione cellulare. A questo punto il QR ritorna a circa 0.7 per il resto del risveglio (John, 2005).

Ibernazione e ibernanti

I Mammiferi sono in grado di produrre calore endogeno per mantenere una temperatura corporea costante entro un ampio intervallo di temperature ambientali; questa capacità conferisce un alto grado di indipendenza dalle condizioni ambientali. Tuttavia, in molti Mammiferi, soprattutto quelli di piccola taglia, il costo energetico del calore endogeno necessario per mantenere la termoregolazione può superare l'energia effettivamente disponibile dall'organismo quando le condizioni ambientali divengono particolarmente avverse (freddo, scarsità di cibo o acqua). Per sopravvivere, questi Mammiferi hanno sviluppato la capacità di entrare in ibernazione. Si tratta di uno stato ipometabolico naturale caratterizzato da una drastica riduzione della temperatura corporea, dell'attività metabolica, del ritmo cardiaco e del bisogno energetico generale, che può durare da poche ore ad alcune settimane, consentendo in tal modo la sopravvivenza dell'animale (French, 1988).

Contrariamente agli animali eterotermi, quali rane e serpenti, i Mammiferi ibernanti sono in grado di uscire dallo stato ipometabolico in ogni momento, utilizzando il calore prodotto dall'organismo per ristabilire la normale temperatura corporea.

Mammiferi appartenenti a diversi ordini sono capaci di entrare fisiologicamente in uno stato ipometabolico (Monotremi, Marsupiali, Chiroteri, Roditori, Primati).

Caratteristiche generali dell'ibernazione

Nonostante si possano riconoscere diversi tipi di ipometabolismo naturale, le caratteristiche del metabolismo, del ritmo cardiaco, dell'attività respiratoria e della temperatura corporea sono fondamentalmente simili, distinguibili solo per gli aspetti quantitativi. Così, nonostante la distribuzione polifiletica dell'ibernazione nei Mammiferi, le specifiche caratteristiche ecologiche delle nicchie e la grande diversità dei tipi di ipometabolismo, esiste una convergenza fisiologica per il raggiungimento di uno stato ipometabolico allo scopo di conservare energia.

Tipicamente, un periodo di ibernazione consiste in una fase di entrata, una di mantenimento e una di risveglio dallo stato ipometabolico. Durante l'entrata nella fase ipometabolica, l'attività cardiaca e respiratoria è progressivamente inibita, mentre il consumo di ossigeno e la temperatura corporea diminuiscono drasticamente. Durante il periodo ipometabolico, che può durare da ore a settimane, tutte le funzioni fisiologiche sono mantenute al minimo: il ritmo

cardiaco scende a circa 1/30 e il consumo di ossigeno a 1/100 dei livelli eutermici; si assiste a prolungati periodi di apnea (40-150 minuti) e a fenomeni respiratori periodici (Cheyne-Stokes); la temperatura corporea si mantiene vicina a quella ambientale (talora vicino a 0°C), ma viene ancora mantenuto un “livello critico” al di sotto del quale un ulteriore abbassamento della temperatura ambientale deve risultare in un adattamento (aumento del metabolismo o addirittura risveglio dall’ibernazione), altrimenti l’animale muore. Il risveglio dall’ibernazione è un evento “esplosivo” in cui, in tempi brevissimi (da 20-30 minuti nei piccoli ibernanti fino a poche ore negli animali di taglia più cospicua), l’animale riacquista tutte le caratteristiche eutermiche: i substrati metabolici sono mobilizzati per la produzione di energia, il sistema cardiovascolare si riattiva favorendo la circolazione sanguigna nei tessuti ed il tessuto adiposo bruno inizia la termogenesi in assenza di brivido.

Nessun Mammifero rimane continuamente in uno stato ipometabolico per l’intera durata della stagione fredda, ma tutti aumentano la loro temperatura corporea e mantengono brevemente uno stato eutermico ad intervalli periodici, la cui durata dipende dalle dimensioni dell’animale (French, 1985) e la cui frequenza è correlata ai cambiamenti della temperatura ambientale (Strijkstra and Daan, 1997).

La ragione di tali risvegli periodici è ancora sconosciuta

Sfortunatamente, malgrado i numerosi studi sull’ibernazione, i meccanismi alla base dell’ipometabolismo naturale sono ancora sconosciuti. La letteratura scientifica è infatti eterogenea (sono state studiate numerose specie animali in diverse condizioni sperimentali) e frammentaria (in ogni specie studiata sono stati investigati solo alcuni aspetti con diversi approcci tecnici).

Tuttavia, quali che siano i meccanismi utilizzati dai Mammiferi ibernanti, la finalità del fenomeno è il raggiungimento di uno stato ipometabolico in cui il consumo di energia sia ridotto al minimo. Ciò significa che, per consentire la sopravvivenza dell’organismo, si rende necessaria una nuova regolazione delle vie metaboliche e fisiologiche.

Energia

Durante l’ibernazione, la fonte principale di energia è costituita dai lipidi accumulati nel tessuto adiposo bianco, mentre l’utilizzo dei carboidrati risulta estremamente ridotto, come anche nel torpore giornaliero.

In estate e nei mesi autunnali gli animali ibernanti diventano iperfagici e si preparano per l'ibernazione aumentando drasticamente il loro peso corporeo, probabilmente grazie all'azione combinata di fattori ambientali (Kortner and Geiser, 2000), enzimi responsabili della lipogenesi (Mostafa et al., 1993) e neuropeptidi specifici capaci di regolare l'appetito (Boswell et al., 1993).

Di conseguenza, durante l'ibernazione i mitocondri utilizzano preferenzialmente le riserve lipidiche per produrre ATP, probabilmente grazie all'attività della leptina, responsabile della mobilitazione dei grassi (Rousseau et al., 2003), e di enzimi responsabili della degradazione degli acidi grassi (Kabine et al., 2003). La trascrizione di geni che codificano per enzimi responsabili del trasporto degli acidi grassi così come l'attività di enzimi implicati nell'utilizzazione dei lipidi aumentano sensibilmente (Hittel and Storey, 2002b; Kabine et al., 2003), e l'attività termogenetica subisce un incremento, soprattutto nel tessuto adiposo bruno (Liu et al., 2001).

Tuttavia, alcuni tessuti, quali il cervello, necessitano di carboidrati per le loro funzioni metaboliche. Poiché il livello di attività glicolitica rimane basso durante il periodo di ipometabolismo (Heldmaier et al., 1989), la gluconeogenesi (la sintesi di glucosio da amminoacidi, lattato e glicerolo, che si svolge principalmente nel fegato e nel rene), rappresenta il solo mezzo per rigenerare le riserve glucidiche durante l'ibernazione. Infatti, le cellule della corteccia surrenale, coinvolte nella regolazione di vari processi metabolici tra cui il catabolismo lipidico e proteico per la gluconeogenesi, mantengono un aspetto attivo durante l'ibernazione (Malatesta et al., 1995; Zancanaro et al., 1997).

Modificazioni cellulari e tissutali durante l'ibernazione

Le cellule ed i tessuti dei mammiferi ibernanti vanno incontro a profonde modificazioni stagionali della loro attività attraverso un ciclo di quiescenza-riattivazione. Durante l'inverno, la temperatura corporea diminuisce in maniera drastica, il ciclo cellulare rallenta notevolmente, l'indice mitotico crolla, la sintesi di DNA, RNA e proteine si riduce al minimo; tuttavia, al risveglio, tutte le attività metaboliche e fisiologiche sono rapidamente ristabilite, anche se il tempo di riattivazione può variare in tessuti coinvolti in diverse funzioni fisiologiche (Kolaeva et al., 1980). Questa straordinaria capacità dei mammiferi ibernanti di variare la loro attività funzionale implica una nuova regolazione delle vie metaboliche ed un adattamento strutturale e

molecolare dei componenti nucleari e citoplasmatici per mantenere l'omeostasi (Zancanaro et al., 2000).

La maggior parte della ricerca sull'ibernazione è stata condotta su specie appartenenti all'ordine dei Roditori. Nella convenzionale suddivisione in sottogruppi dei Roditori, i *Myomorpha* comprendono molti ibernanti, quali il moscardino (*Muscardinus avellanarius*) e il ghio (*Glis glis*). Questi animali sono piuttosto comuni in Europa, possono essere facilmente mantenuti in cattività in buona salute e, in queste condizioni, entrano in ibernazione senza difficoltà. Queste caratteristiche li rendono particolarmente adatti agli studi sull'ibernazione, sebbene queste specie siano protette dalla legge e solo un numero limitato di esemplari possa essere utilizzato, previo permesso delle autorità competenti.

Il nucleo

Nonostante l'attività trascrizionale sia fortemente inibita durante l'ibernazione (Van Breukelen and Martin, 2002), studi ultrastrutturali condotti su vari tessuti (fegato, tessuto adiposo bruno, pancreas, corteccia surrenale) di *Muscardinus avellanarius* e *Glis glis* hanno rivelato che l'aspetto generale dei nuclei cellulari non cambia in maniera significativa tra eutermia e ibernazione (Zancanaro et al., 1993;Malatesta et al., 1994;Malatesta et al., 1995;Malatesta et al., 1999). Tuttavia, i nuclei cellulari di moscardini e ghiri ibernanti contengono vari costituenti strutturali “inusuali”, non individuabili in eutermia: a) *coiled bodies* (Zancanaro et al., 1993;Malatesta et al., 1994;Malatesta et al., 1999); b) *amorphous bodies* (Zancanaro et al., 1993;Malatesta et al., 1994;Malatesta et al., 1999;Malatesta et al., 2003); c) *dense granular bodies* (Tamburini et al., 1996); d) *lattice-like bodies* (Malatesta et al., 1995); e) fasci di fibre nucleoplasmatiche di natura proteica (Zancanaro et al., 1993;Malatesta et al., 1994;Malatesta et al., 1995;Malatesta et al., 1999).

Gli organelli citoplasmatici

La principale fonte di energia chimica nella cellula è il mitocondrio, dove carboidrati, acidi grassi e aminoacidi sono utilizzati per produrre ATP. Durante l'ibernazione, le funzioni mitocondriali sono drasticamente ridotte, sebbene non cessino completamente. Di conseguenza, i mitocondri vanno incontro a modificazioni morfofunzionali in diversi tessuti di mammiferi ibernanti (Brustovetsky et al., 1993a;Malatesta et al., 2001;Hittel and Storey, 2002a;Kabine et al., 2003). In particolare, in vari tessuti di moscardini e ghiri ibernanti (fegato,

pancreas, tessuto adiposo bruno, corteccia surrenale), le dimensioni mitocondriali e l'estensione della membrana interna aumentano significativamente. Queste modificazioni strutturali sono correlate all'utilizzo preferenziale degli acidi grassi al posto dei carboidrati quale substrato energetico durante l'ibernazione (Halestrap and Dunlop, 1986; Halestrap, 1987; French, 1988). Inoltre, il numero di granuli della matrice mitocondriale, strutture contenenti componenti inorganici (calcio, fosforo, sodio, magnesio, cloro) ed organici (lipidi, fosfolipidi, glicoproteine, citocromo c ossidasi) coinvolti nella regolazione di numerose funzioni mitocondriali (Bronnikov et al., 1990; Brustovetsky et al., 1993b; Jacob et al., 1994), aumenta notevolmente durante l'ibernazione e diminuisce al risveglio in molti tessuti di moscardino e ghiro. Ciò suggerisce che essi rappresentino siti di accumulo di substrati necessari per le funzioni respiratorie, che verrebbero rapidamente utilizzati al risveglio. Tale ipotesi è rafforzata dall'osservazione che i granuli della matrice sono quasi assenti nei mitocondri del tessuto adiposo bruno, dove avviene il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa con conseguente produzione di calore invece che di ATP (Wang et al., 1997).

Il Fegato

Il fegato è coinvolto in molteplici attività metaboliche e fisiologiche, essendo strategicamente localizzato tra l'intestino e la circolazione generale: riceve, metabolizza e trasforma molti dei prodotti della digestione, degrada e detossifica composti tossici, sintetizza molte proteine del plasma sanguigno ed esercita un importante controllo sul metabolismo generale. Gli epatociti sono, quindi, cellule multifunzionali fortemente influenzate dai drastici cambiamenti collegati al ciclo eutermia-ibernazione-risveglio. In relazione al forte calo della sintesi di proteine epatiche (Whitten and Klain, 1968), il reticolo endoplasmatico ruvido e l'apparato di Golgi appaiono molto ridotti durante l'ibernazione, mentre il reticolo endoplasmatico liscio aumenta e si accumulano nel citoplasma gocce lipidiche e glicogeno (Malatesta et al., 2002). Al risveglio, tutti gli organelli citoplasmatici ritornano alle caratteristiche eutermiche, le gocce lipidiche ed il glicogeno sono assai scarsi e numerosi corpi residui sono presenti nel citoplasma. E' interessante notare come durante l'ibernazione gli epatociti subiscano una significativa diminuzione delle loro dimensioni (sia del citoplasma che del nucleo), probabilmente non solo a causa della riduzione volumetrica degli organelli citoplasmatici, ma anche ad una perdita di liquidi che potrebbero essere richiesti in alcuni compartimenti

dell'organismo durante il periodo ipometabolico, quando l'animale non assume né acqua né cibo.

Immunocitochimica ultrastrutturale

L'immunochimica è la tecnica per rivelare antigeni usando anticorpi diretti specificatamente contro l'antigene stesso. Si parla di immunocitochimica quando per visualizzare la localizzazione dell'avvenuto legame antigene cellulare-anticorpo si usa il microscopio elettronico e si parla invece di immunoistochimica quando si utilizza il microscopio ottico. In queste tecniche la specificità della localizzazione è fornita dalla specificità della reazione antigene-anticorpo.

Esistono strategie diverse per rendere visibile la formazione dell'immunocomplesso antigene-anticorpo. In particolare in questa tesi ci siamo avvalsi di un metodo di immunocitochimica indiretta. In questa tecnica l'antigene di interesse viene esposto all'anticorpo primario che si lega all'antigene. Dopo lavaggi per togliere l'anticorpo in eccesso che non si è legato, viene applicato l'anticorpo secondario, preparato in una specie diversa e diretto contro le immunoglobuline dell'anticorpo primario. In questa tecnica all'anticorpo secondario è legato un marcatore che può essere visualizzato al microscopio elettronico (**Fig. 1**).

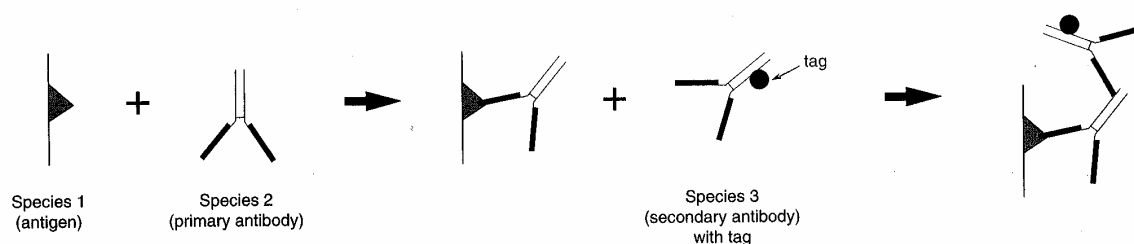


Figura 1. Rappresentazione schematica del metodo di immunocitochimica indiretta (tratto da Bozzola and Russell, 1999)

L'uso dell'anticorpo secondario marcato permette un'amplificazione del segnale in quanto diversi anticorpi secondari possono legarsi ad un singolo anticorpo primario (**Fig. 2**).

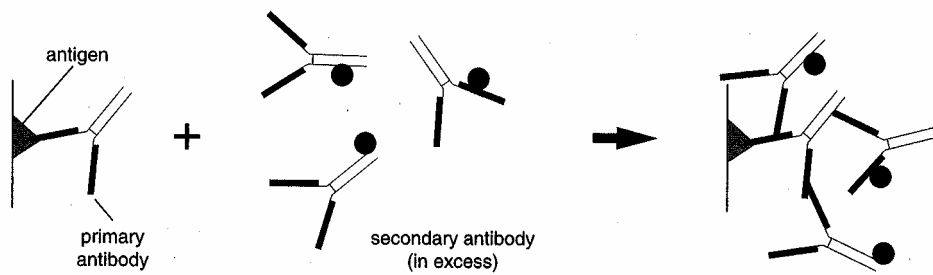


Figura 2. Rappresentazione schematica dell'amplificazione del segnale nel metodo di immunocitochimica indiretta (tratto da Bozzola and Russell, 1999)

Il marcatore più comunemente utilizzato in immunocitochimica è l'oro colloidale. Le particelle di oro colloidale sono costituite da un nucleo di oro circondato da un doppio strato di ioni negativi. Hanno una forte elettrondensità e consentono un'elevata risoluzione e una fine localizzazione dell'antigene (**Fig. 3**). Inoltre l'oro colloidale consente una visualizzazione semiquantitativa della marcatura (Mayhew, 2007).

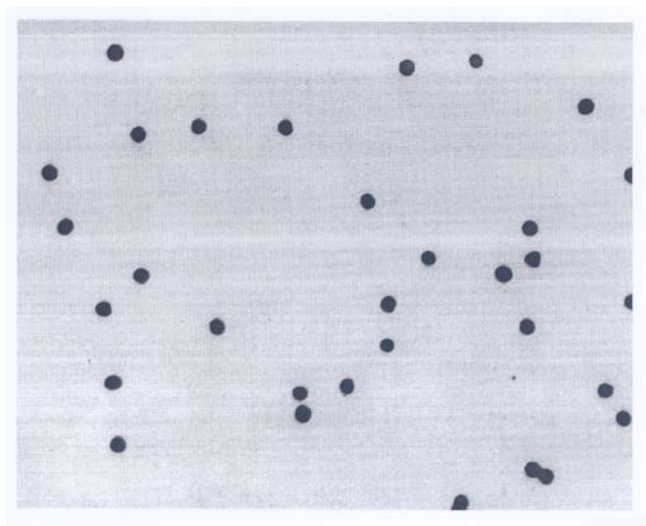


Figura 3. Particelle do oro colloidale su una pellicola di supporto (tratto da Bozzola and Russell, 1999)

Materiali e Metodi

Raccolta campioni

In questa tesi sono stati utilizzati 12 moscardini (*Muscardinus Avellanarius*). Questi roditori, animali selvatici, sono in Europa protetti dalla legge e quindi solo un numero limitato di esemplari possono essere raccolti per scopi di ricerca, previa autorizzazione delle autorità competenti. Gli animali sono stati raccolti e mantenuti in gabbie esterne in cui erano disponibili cibo e lettiera. In tali condizioni i moscardini spontaneamente iniziano a ibernare in novembre e si risvegliano in marzo. Sono stati sacrificati tre moscardini durante la fase di ibernazione (novembre – gennaio), tre durante il risveglio (marzo) e tre durante il periodo eutermico (giugno - luglio). Gli animali ibernati sono stati prelevati dalle gabbie e immediatamente sacrificati per dislocazione cervicale. Gli animali in risveglio sono stati sacrificati quando una sonda appoggiata sull'addome (mantenuta ferma dalla naturale posizione raggomitolata dell'animale ibernato) ha indicato il raggiungimento della temperatura corporea di 26°C . Gli eutermici sono stati anestetizzati con etere e successivamente sacrificati.

Processazione dei tessuti

Processazione per il controllo morfologico

Campioni di fegato sono stati velocemente rimossi, sezionati e piccoli frammenti sono stati fissati per immersione in una mistura di 2.5% glutaraldeide in 0.1M tampone fosfato di Sorensen, pH 7.4, a 4° C per 2 ore, lavati e post-fissati in 1% tetrossido di osmio e 1.5% potassio ferrocianuro a 4° C per 1 ora, disidratati e inclusi in resina epossidica (Epon 812). La resina è stata preparata miscelando i seguenti componenti:

60 ml DDSA

20 ml Epon 812

20 ml Durcupan

Dopo aver agitato a lungo la miscela, sono stati aggiunti 2 ml di DMP 30 come acceleratore.

Le fasi della processazione sono di seguito riportate:

- PBS a temperatura ambiente (TA) per 5 minuti
- PBS a TA per 5 minuti
- PBS a TA per 5 minuti
- acetone al 60% a TA per 5 minuti
- acetone al 60% a TA per 5 minuti
- acetone al 60% a TA per 5 minuti
- acetone al 60% a TA per 5 minuti
- acetone al 60% a TA per 5 minuti
- acetone al 100% a TA per 5 minuti
- acetone al 100% a TA per 5 minuti
- acetone al 100% a TA per 5 minuti
- acetone al 100% a TA per 5 minuti
- acetone al 100% a TA per 5 minuti
- Resina Epon al 50% in acetone a 60°C per 20 minuti
- Resina Epon al 75% in acetone a 60°C per 20 minuti
- Resina Epon assoluta a 60°C per 20 minuti

Le miscele di resina al 50 e al 75% e la resina assoluta sono state pre-riscaldate in stufa a 60°C.

L'inclusione e' stata effettuata a 60°C.

La polimerizzazione e' stata effettuata in stufa a 60°C overnight

Sezioni semifini (0.5 μm di spessore) sono state colorate con 1% blu di toluidina e osservate al microscopio ottico. Sezioni ultrafini, ottenute tramite taglio all'ultramicrotomo e raccolte su apposite griglie, sono state colorate con actato di uranile e piombo citrato e osservate al microscopio elettronico (Philips Morgagni).

Processazione per l'analisi immunocitochimica

Campioni di fegato di piccole dimensioni raccolti secondo le stesse modalita` sopra descritte sono stati fissati per immersione in 4% paraformaldeide in 0.1M tampone fosfato di Sorensen a 4° C per 2 ore. La paraformaldeide e` un fissativo che mantiene meglio della glutaraldeide l'immunogenicit  del campione. Dopo lavaggio in tampone di Sorensen e in tampone fosfato/salina (PBS), le aldeidi libere sono state bloccate in 0.5M NH₄Cl in PBS a 4° C per 45 minuti. Dopo lavaggi in PBS, i campioni sono stati disidratati attraverso una scala ascendente di etanolo e incluse in resina Lowicryl K₄M polimerizzata con raggi UV. Per l'applicazione di protocolli di immunoistochimica e` preferibile utilizzare resine miscibili con l'acqua, come Lowicryl K₄M, poiche` queste permettono la parziale penetrazione di molecole di acqua che contengono substrati o anticorpi. Inoltre tale resina, polimerizzando a temperature basse, favorisce la conservazione delle caratteristiche antigeniche del tessuto (Hayat, 2000).

Le fasi della processazione sono di seguito riportate:

- etanolo al 30% a 0°C per 30 minuti
- etanolo al 50% a -20°C per 60 minuti
- etanolo al 70% a -35°C per 60 minuti
- etanolo al 95% a -35°C per 60 minuti
- etanolo al 95% a -35°C per 60 minuti
- etanolo al 100% a -35°C per 60 minuti
- etanolo al 100% a -35°C per 60 minuti
- etanolo/ K₄M 1:1 a -35°C per 60 minuti
- etanolo/ K₄M 1:2 a -35°C per 60 minuti
- Lowicryl K₄M a -35°C per 30 minuti
- Lowicryl K₄M a -35°C overnight

L'inclusione e` stata effettuata a -30/-35°C.

La polimerizzazione e` stata effettuata in due fasi:

- a -30°C per 48 ore sotto raggi UV
- a temperatura ambiente per 72 ore

Sezioni semifini (0.5 μm di spessore) sono state colorate con 1% blu di toluidina e osservate al microscopio ottico. Sezioni ultrafini, ottenute tramite taglio all'ultramicrotomo e raccolte su apposite griglie, sono state sottoposte a procedure immunocitochimiche. L'osservazione è stata effettuata al microscopio elettronico Philips Morgagni.

Immunocitochimica

Anticorpi

Anticorpi primari

Gli anticorpi primari utilizzati sono i seguenti:

Anti-Fatty Acid Synthase, mouse monoclonal (BD Biosciences Pharmingen, 610962)

Anti-Long Chain Fatty Acid CoA ligase 1, rabbit polyclonal (Aviva System Biology, ARP32784)

Anticorpi secondari

Gli anticorpi secondari utilizzati sono i seguenti:

Goat anti rabbit: EM GAR G15:15nm gold labelled goat anti rabbit IgG (H+L) (Auroprobe, RPN422)

Goat anti mouse: EM GAM IgG G15: 15nm gold labelled goat anti mouse IgG (Fc) (Auroprobe, RPN444)

Sieri normali

Normal goat serum 1:100 in PBS

Protocollo

Le griglie contenenti le sezioni ultrafini sono state esposte in sequenza ai reagenti elencati di seguito:

- Incubazione con siero normale 1:100 → 3 minuti/ 20°C

- Incubazione con anticorpo primario → overnight/ 4°C
- Lavaggio con tampone → 3 minuti/ 20°C
- Incubazione con siero normale 1:100 → 3 minuti/ 20°C
- Incubazione con anticorpo secondario 1:20 → 45 minuti/ 20°C
- Lavaggio con tampone → 3 minuti/ 20°C
- Lavaggio con acqua → 3 minuti/ 20°C
- Asciugatura all'aria → 10 minuti/ 20°C
- Colorazione con Acetato di Uranile 2,5% per 2 minuti e 0.5% Piombo Citrato per 1 minuti

Condizioni e variabili testate

Nel corso di varie prove, per i singoli anticorpi sono state testate diverse diluizioni:

- ACSL-1: 1:10 (concentrazione ottimale); 1:20; 1:50
- FAS: 1:2 (concentrazione ottimale); 1:5; 1:10; 1:50

Sono stati usati diversi tamponi a diversi pH per la diluizione degli anticorpi e per i lavaggi con lo scopo di ridurre il background:

- PBS pH 7,4: che è risultato il tampone ottimale per la diluizione del anticorpo anti FAS
- Tris pH 8,1: che è risultato il tampone ottimale per la diluizione del anticorpo anti ACSL-1

Analisi semi-quantitativa

Ottenuto il protocollo ottimale sono stati eseguiti immunomarcaggi su fegati di moscardini attivi (n=3), ibernanti (n=3) e in risveglio (n=3).

Per poter confermare le osservazioni qualitative sulla distribuzione di ACSL-1 e FAS negli epatociti è stata eseguita un'analisi semi-quantitativa della densità di superficie della marcatura nei vari compartimenti cellulari, espressa come numero di grani d'oro colloidale per unità di area.

Per ogni animale sono state acquisite immagini ad ingrandimento nominale di 18000X.

In particolare, per ciascun animale e per ciascuna fase del ciclo annuale (attività, ibernazione e risveglio) è stata misurata la densità della marcatura in:

- 20 nuclei, per un'area totale di circa $280\mu\text{m}^2$
- Da 30 a 35 aree citoplasmatiche libere da inclusioni (glicogeno, vescicole lipidiche) per un totale di $200\mu\text{m}^2$
- 50 mitocondri

I valori ottenuti sono stati raggruppati per fase del ciclo annuale e sottoposti ad analisi statistica (ANOVA, due vie) per verificare la significatività delle differenze riscontrate (la significatività è stata fissata a $p \leq 0.05$).

Risultati

Controllo morfologico

In **Fig. 4** è riportata un'immagine di un fegato di moscardino eutermico fissato in una miscela di glutaraldeide ed incluso in Epon per il controllo morfologico.

Distribuzione intracellulare della marcatura

Acido grasso sintetasi (FAS):

L'immunomarcatura con l'anticorpo anti-FAS rivela alcune modificazioni della distribuzione intracellulare dell'enzima durante il ciclo stagionale. Negli animali eutermici (Fig. 5) ed ibernanti (Fig. 6) il segnale è quasi esclusivamente citoplasmatico, in particolare sono marcate le vescicole del reticolo endoplasmatico liscio, risultano invece quasi completamente negativi mitocondri e nucleo (Fig. 7). Negli animali in fase di risveglio la marcatura sembra aumentare all'interno di alcuni mitocondri (Fig 8).

Acil Co A sintetasi per acidi grassi a catena lunga (ACSL-1):

La distribuzione della marcatura con l'anticorpo anti-ACSL-1 nei compartimenti cellulari degli epatociti di moscardino risulta simile in tutte le fasi stagionali considerate. Sono infatti marcati sia il citoplasma, sia i mitocondri, sia il nucleo in tutte e tre le fasi del ciclo annuale. Nel citoplasma il segnale si presenta prevalentemente associato alle vescicole del reticolo endoplasmatico liscio, anche se una parte appare diffusa nel citosol (Fig. 9, 10 e 11); nei mitocondri i grani d'oro colloidale sono distribuiti sia sulle membrane sia nella matrice; nel nucleo la marcatura risulta preferenzialmente associata alle fibrille pericromatiniche, sito di trascrizione e splicing del pre-mRNA, e solo in minor misura al nucleolo (Fig. 12 e 13).

Valutazione quantitativa della marcatura

La valutazione quantitativa della marcatura ottenuta con i due anticorpi nei tre compartimenti – citoplasma, mitocondri, nucleo – degli epatociti di moscardini eutermici, ibernanti e in fase di

risveglio ha rivelato differenze statisticamente significative per entrambi gli enzimi, sia in relazione alla fase stagionale che alla distribuzione negli stessi compartimenti (Tabella 1).

Tabella 1. Risultati dell'analisi statistica (two-way ANOVA test) della densità di immunomarcatura (grani d'oro colloidale/ μm^2) relativa ai fattori “compartimento cellulare” (citoplasma, mitocondri, nucleo), “fase stagionale” (eutermia, ibernazione, risveglio) e al termine di interazione “compartimento cellulare-fase stagionale”.

ACSL-1	<i>gdl</i>	<i>F</i>	<i>Valore di significatività</i>
Compartimento cellulare	2	5,098	P=0,006
Fase stagionale	2	23,726	P<0,001
Termine di interazione compartimento cellulare-fase stagionale	4	3,134	P=0,041
FAS	<i>gdl</i>	<i>F</i>	<i>Valore di significatività</i>
Compartimento cellulare	2	8,147	P<0,001
Fase stagionale	2	5,761	P=0,003
Termine di interazione compartimento cellulare-fase stagionale	4	5,054	P<0,001

Confrontando la densità della marcatura in un dato compartimento cellulare fra due delle fasi annuali (eutermia vs ibernazione; ibernazione vs risveglio, eutermia vs risveglio) mediante test post hoc, si dimostra che la marcatura relativa all'enzima ACSL-1 aumenta considerevolmente dall'eutermia all'ibernazione in tutti i compartimenti cellulari considerati; al risveglio i valori si mantengono elevati nei mitocondri e nel nucleo, mentre diminuiscono significativamente nel citoplasma (pur mantenendosi al di sopra dei livelli eutermici) (Fig. 14).

La marcatura relativa all'enzima FAS diminuisce drasticamente dall'eutermia all'ibernazione nel citoplasma, per poi aumentare al risveglio, pur mantenendosi nettamente al di sotto dei valori eutermici. Nei mitocondri, dove la marcatura è assai scarsa sia in eutermia che in ibernazione, il segnale aumenta significativamente al risveglio; nel nucleo, invece, il segnale si mantiene a valori bassi in tutte le fasi stagionali considerate (Fig. 14).

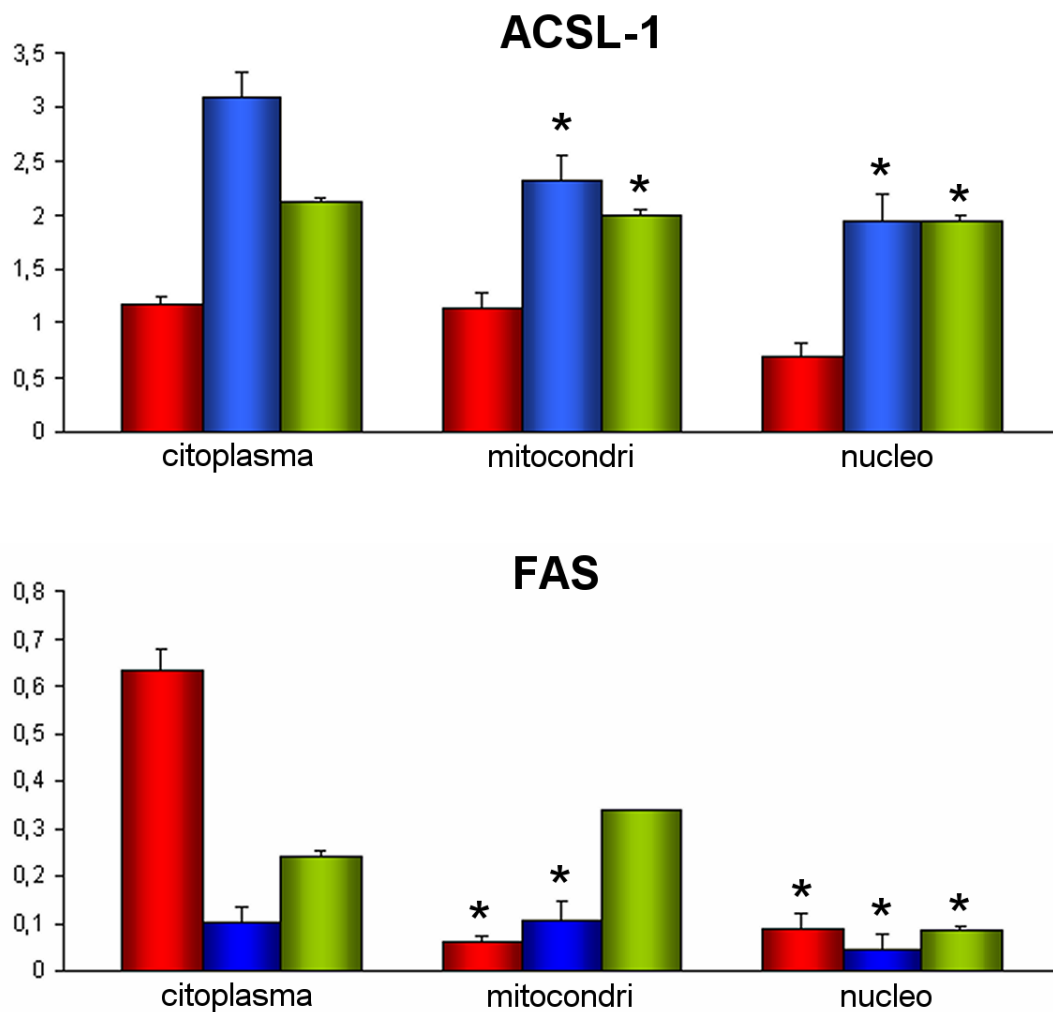


Figura 14. Valori medi \pm SE delle densità di immunomarcatura (grani d'oro colloidale/ μm^2) ottenuti in diversi compartimenti cellulari (citoplasma, mitocondri, nucleo) con anticorpi diretti contro gli enzimi ACSL-1 e FAS in epatociti di moscardini eutermici (*rosso*), ibernanti (*azzurro*) e in risveglio (*verde*). In ogni istogramma, i valori identificati dallo stesso simbolo non sono significativamente diversi l'uno dall'altro (test post hoc: Bonferroni). I valori medi \pm SE di background, calcolati sulla resina priva di tessuto, sono $0,04\pm0,01$ grani d'oro colloidale/ μm^2 per l'anticorpo anti-ACSL-1 e $0,05\pm0,01$ per l'anticorpo anti-FAS.

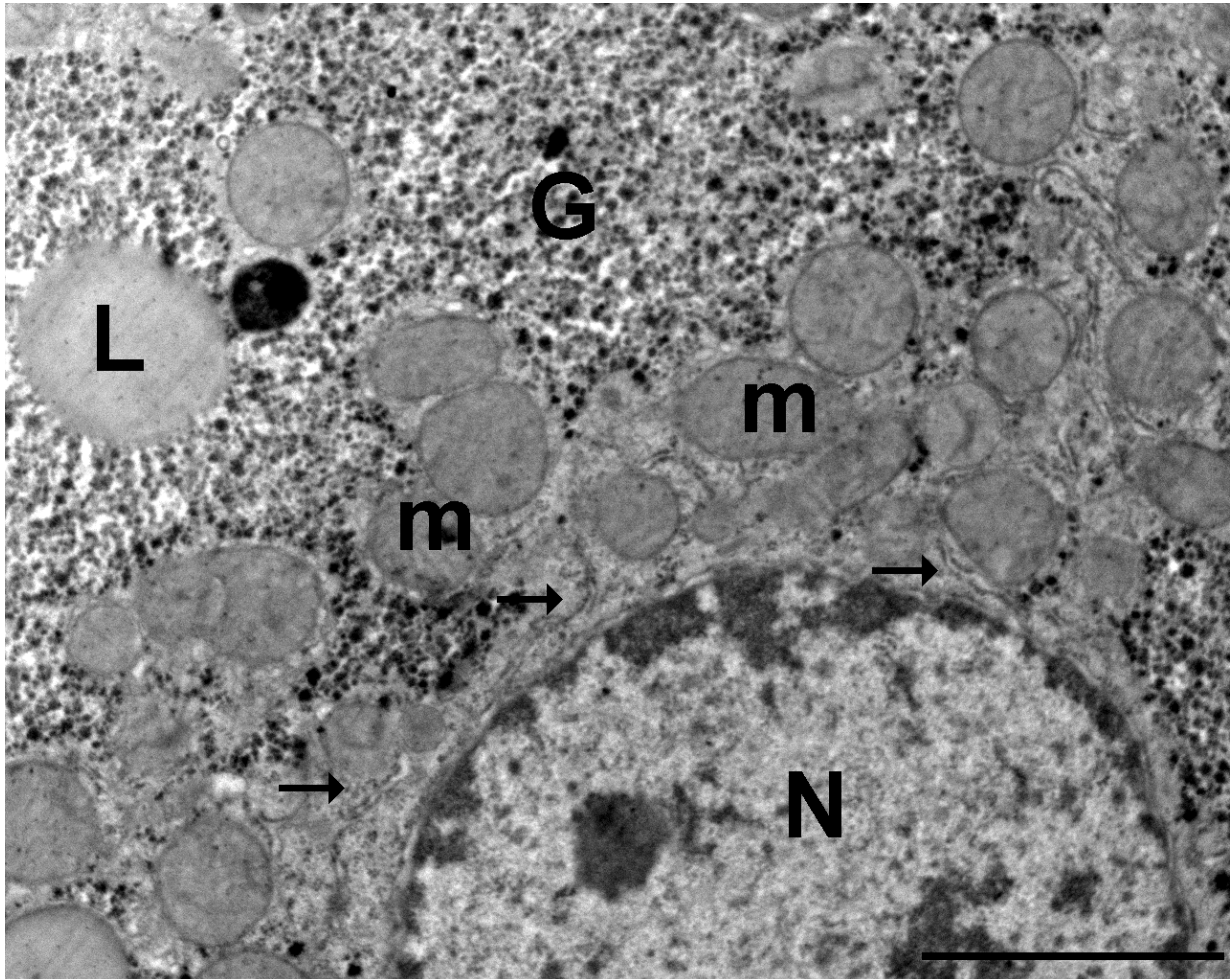


Fig 4. Epatocita di moscardino eutermico, usato per il controllo morfologico (fissato con glutaraldeide e incluso in Epon 812). Il nucleo (N) appare rotondeggiante; nel citoplasma sono presenti cisterne di RER (freccie), numerosi mitocondri (m), abbondante glicogeno (G) e gocce lipidiche (L). Barra = 2 μ m

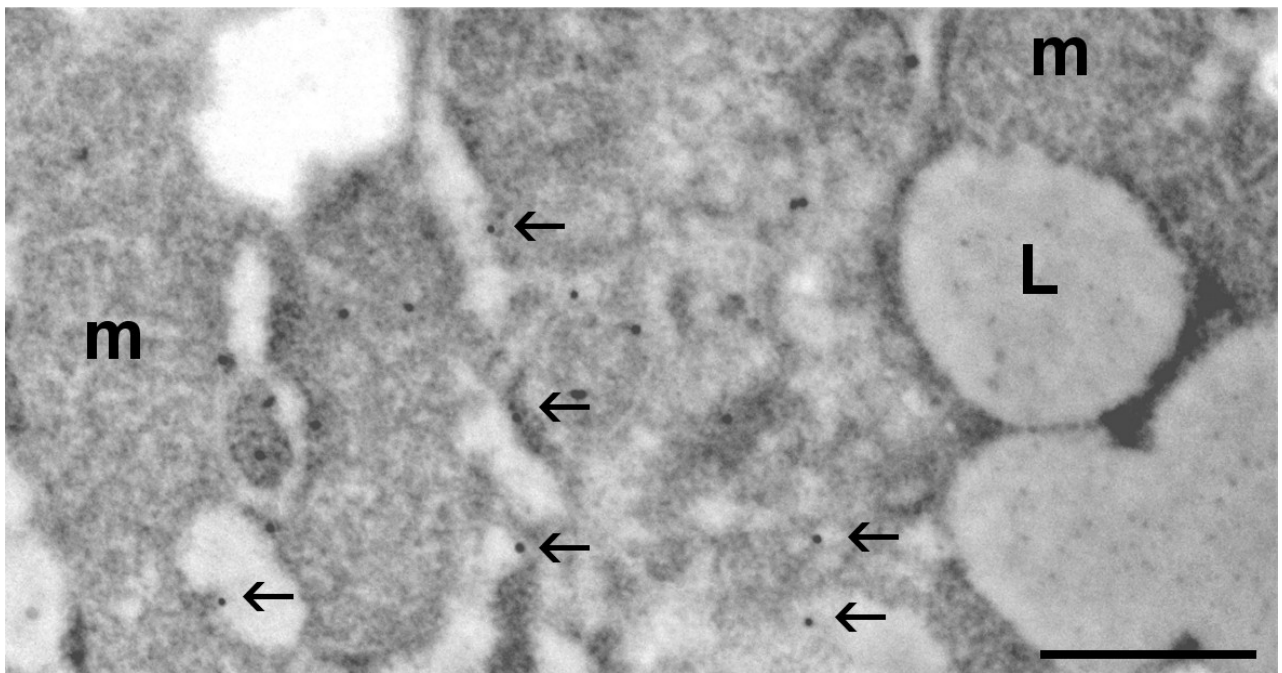


Fig. 5. Epatocita di moscardino eutermico, anticorpo anti-FAS. La marcatura appare quasi esclusivamente distribuita nel citoplasma, associata a vescicole del reticolo endoplasmatico liscio (freccie), mentre i mitocondri (m) non mostrano segnale specifico. Sono visibili alcune gocce lipidiche (L). Barra= 0,5 μ m.

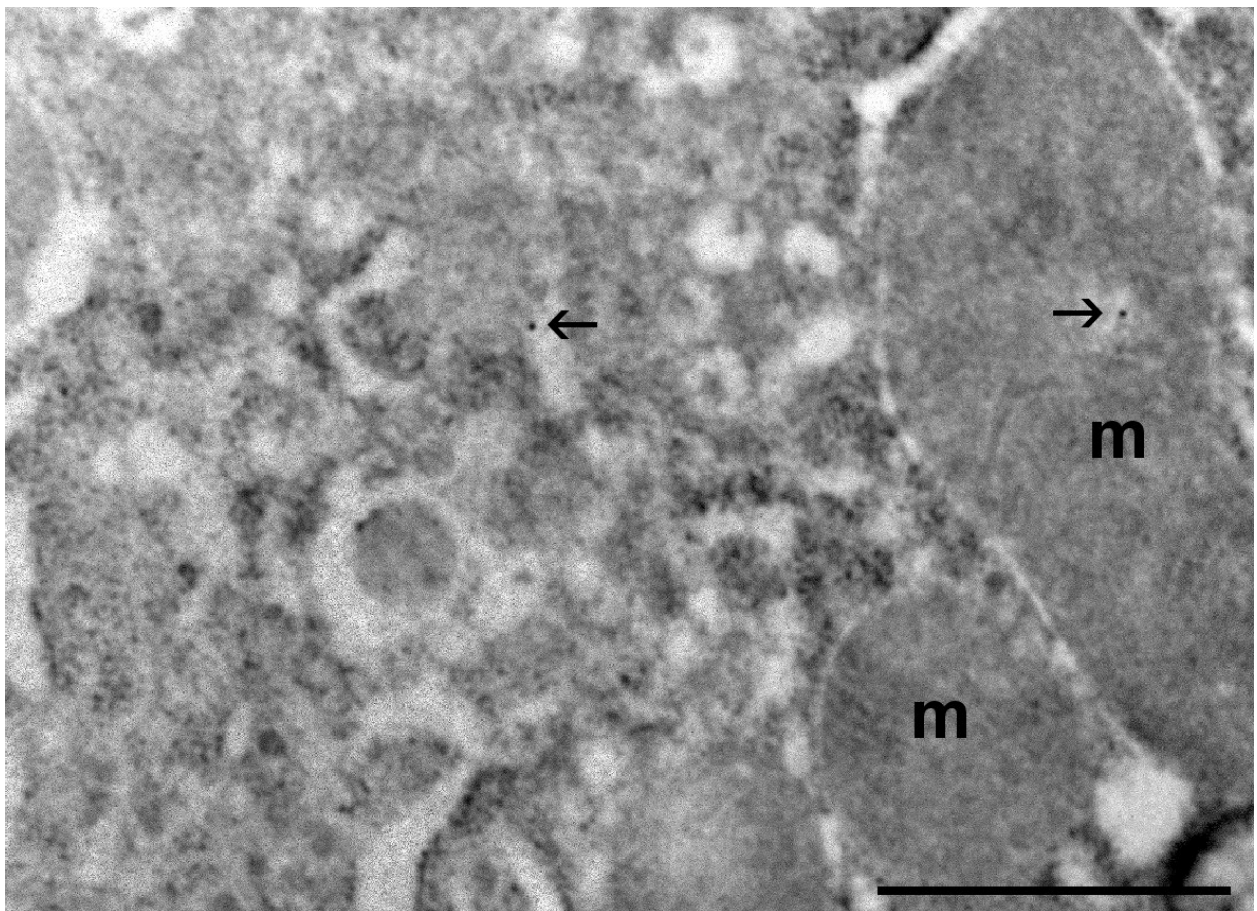


Fig. 6. Epatocita di moscardino ibernante, anticorpo anti-FAS. La marcatura (freccce) è assai scarsa sia nel citoplasma sia nei mitocondri (m). Barra= 1 μ m.

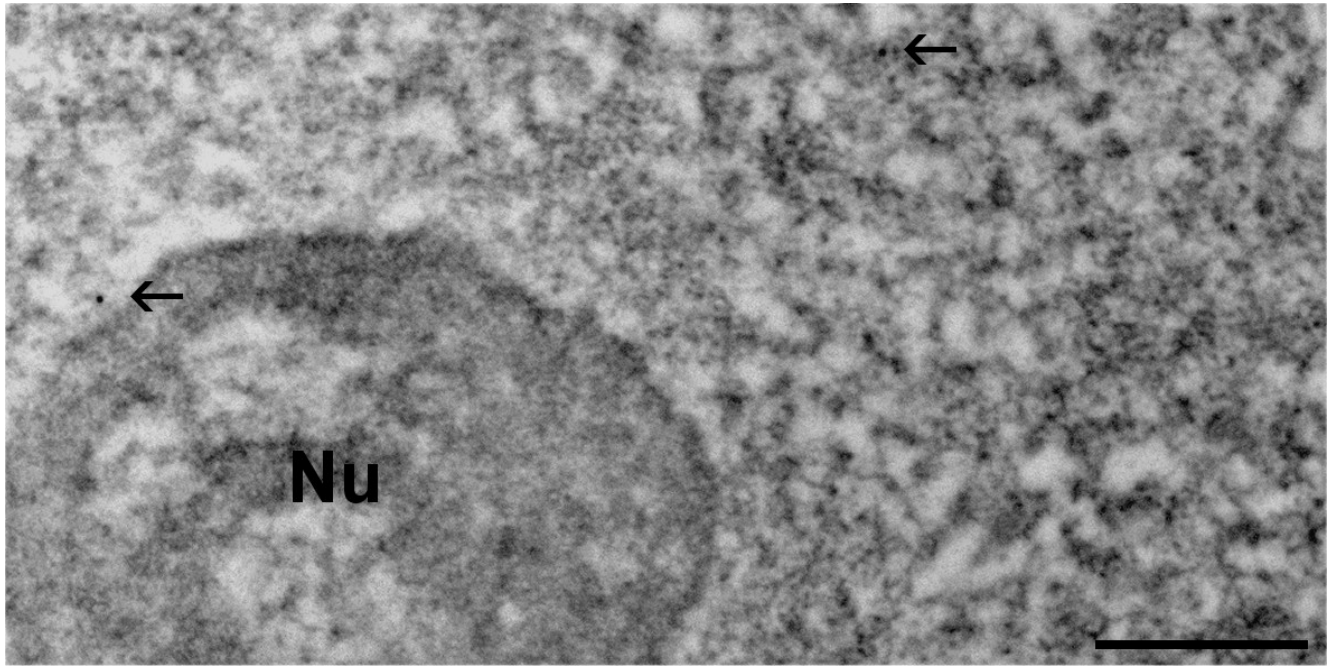


Fig. 7. Nucleo di epatocita di moscardino eutermico, anticorpo anti-FAS. La marcatura (frece) è trascurabile sia nel nucleoplasma che nel nucleolo (Nu). Barra= 0,5 μ m.

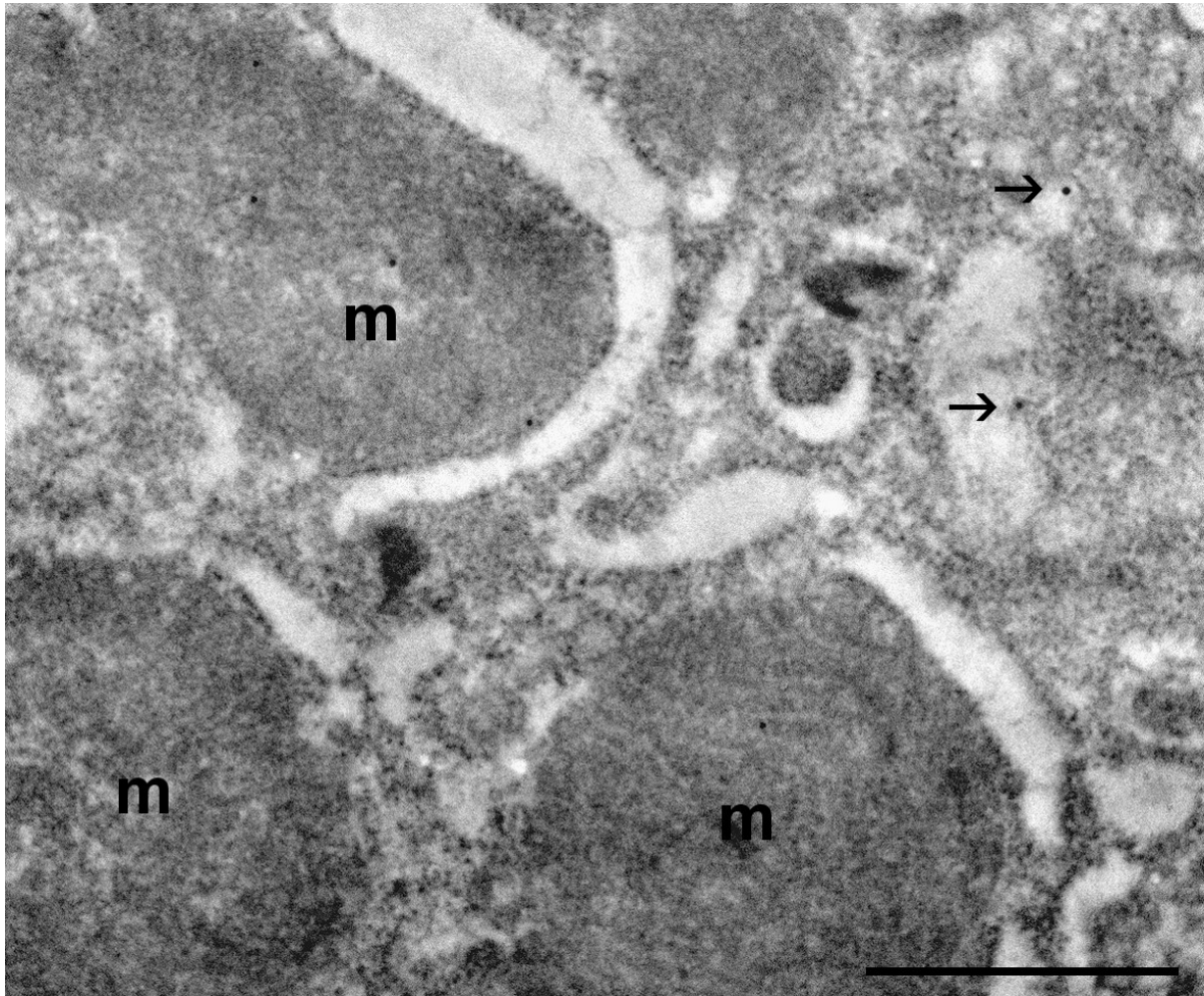


Fig. 8. Epatocita di moscardino in fase di risveglio, anticorpo anti-FAS. La marcatura è presente nel reticolo endoplasmatico liscio (freccce) e all'interno dei mitocondri (m). Barra= 1 μ m.

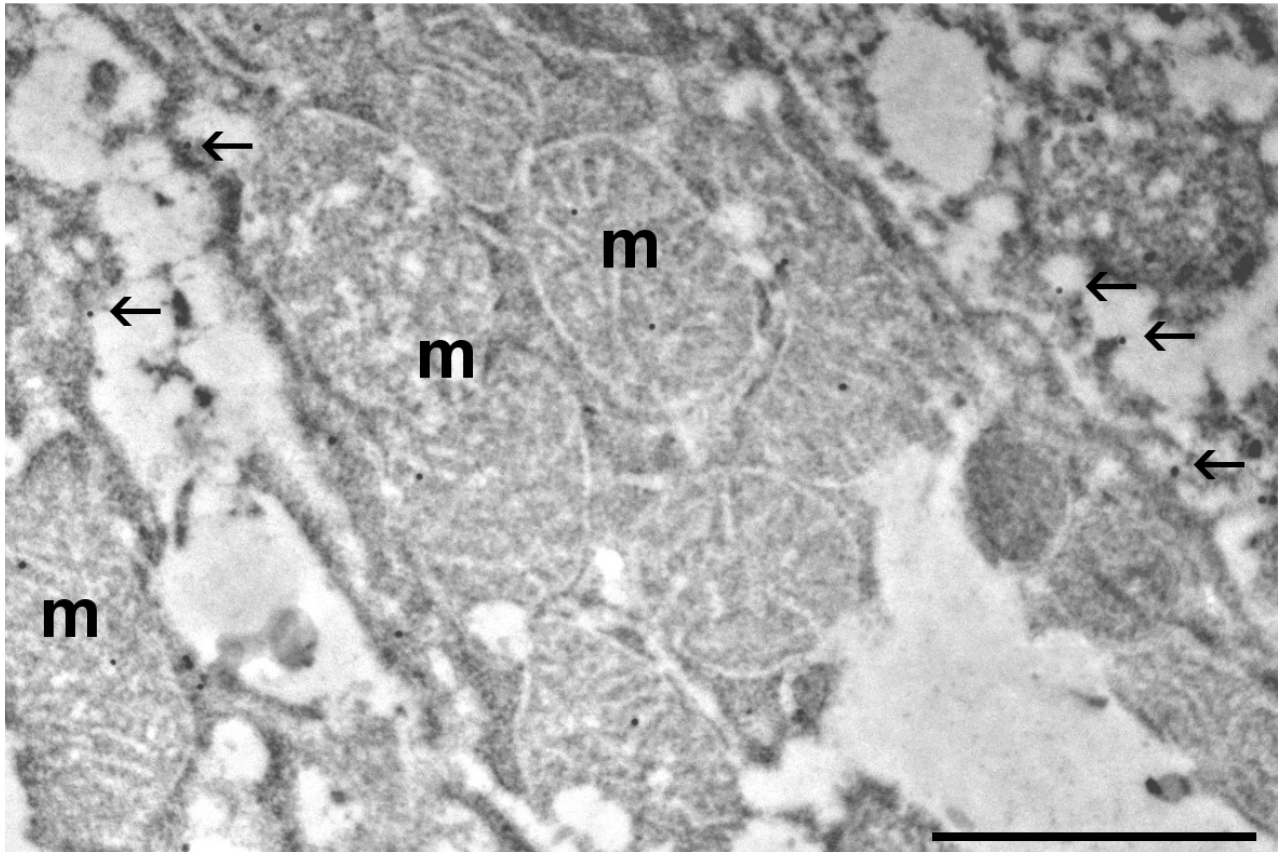


Fig. 9. Epatocita di moscardino eutermico, anticorpo anti-ACSL-1. La marcatura appare distribuita nel citoplasma, associata a vescicole del reticolo endoplasmatico liscio (freccie) e all'interno dei mitocondri (m). Barra= 1 µm.

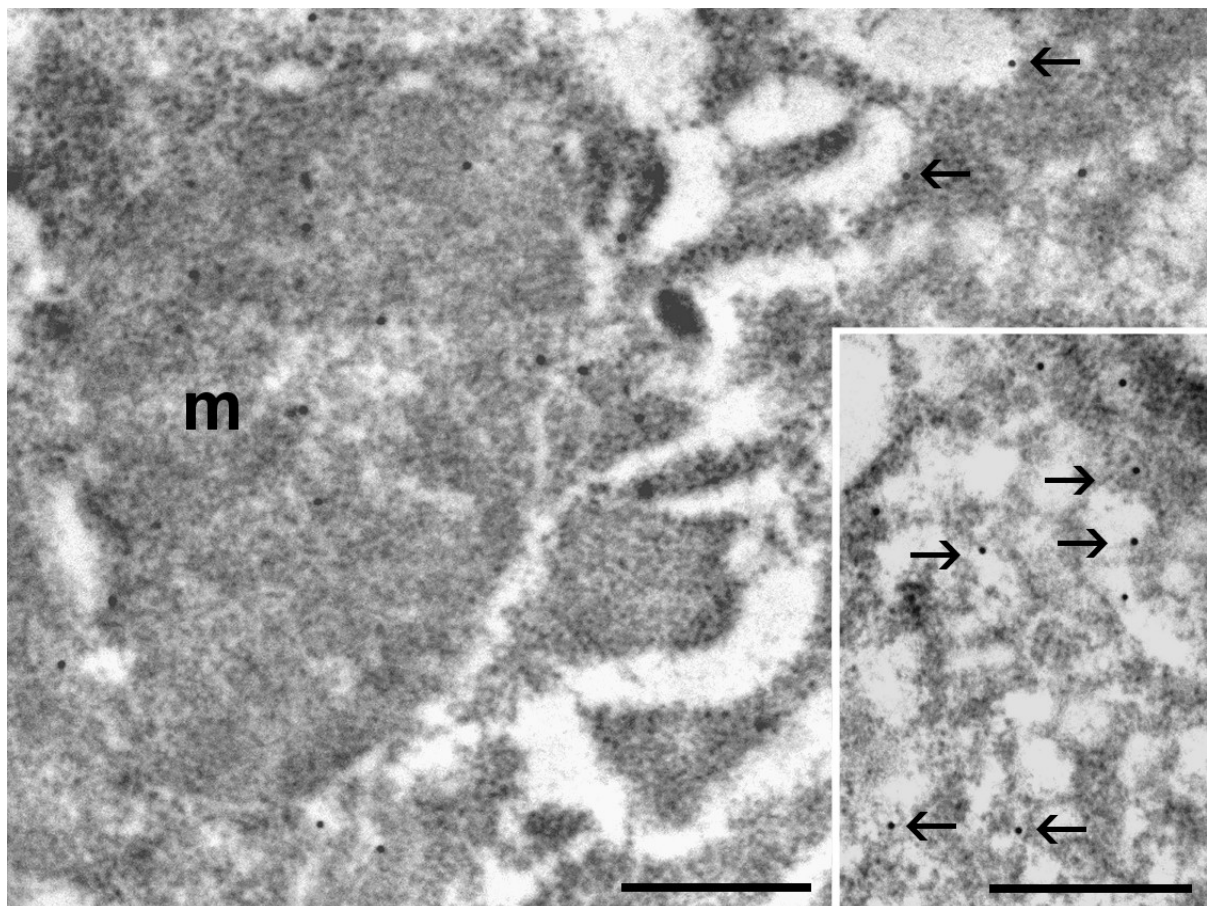


Fig. 10. Epatocita di moscardino ibernante, anticorpo anti-ACSL-1. La marcatura, piuttosto abbondante, è prevalentemente associata alle vescicole del reticolo endoplasmatico liscio (freccie) e ai mitocondri (m). Barre= 0,5 μ m.

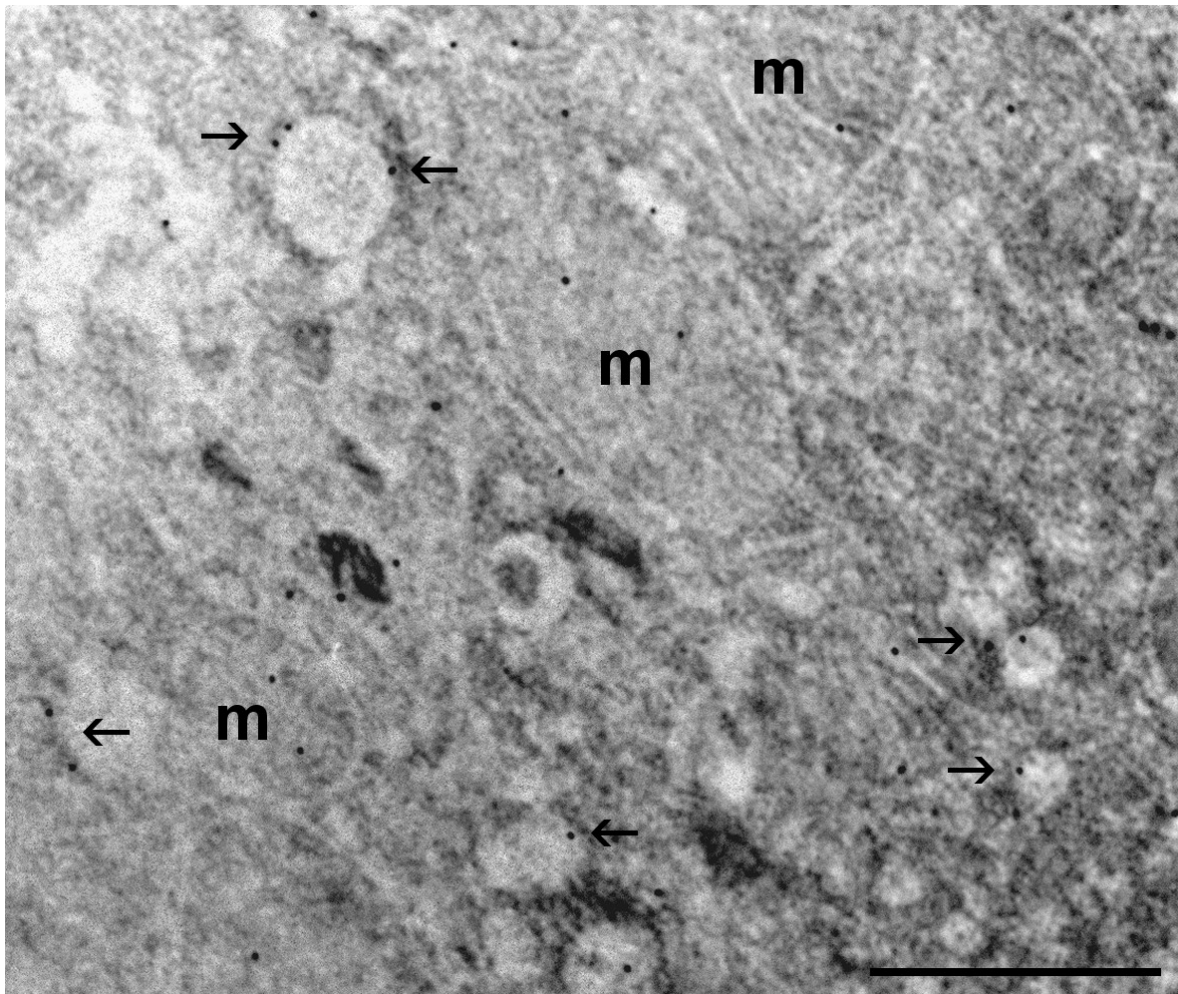


Fig. 11. Epatocita di moscardino in fase di risveglio, anticorpo anti-ACSL-1. La marcatura appare preferenzialmente associata alle vescicole del reticolo endoplasmatico liscio (freccie) e ai mitocondri (m). Barra= 0,5 μ m.

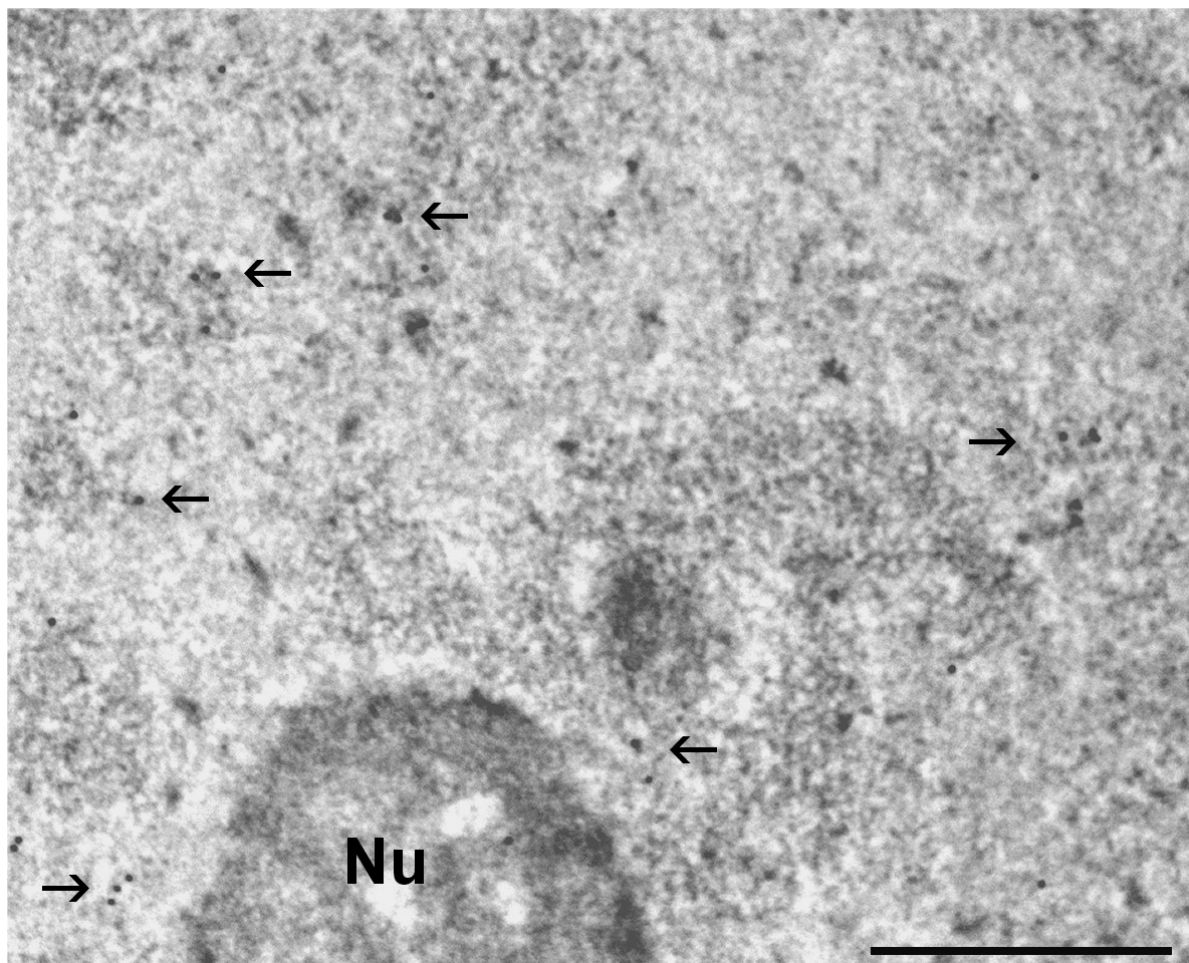


Fig. 12. Nucleo di epatocita di moscardino eutermico, anticorpo anti-ACSL-1. La marcatura è distribuita preferenzialmente nel nucleoplasma, nella regione pericromatinica ricca di fibrille pericromatiniche (freccie), mentre risulta scarsa nel nucleolo (Nu). Barra= 1 μ m.

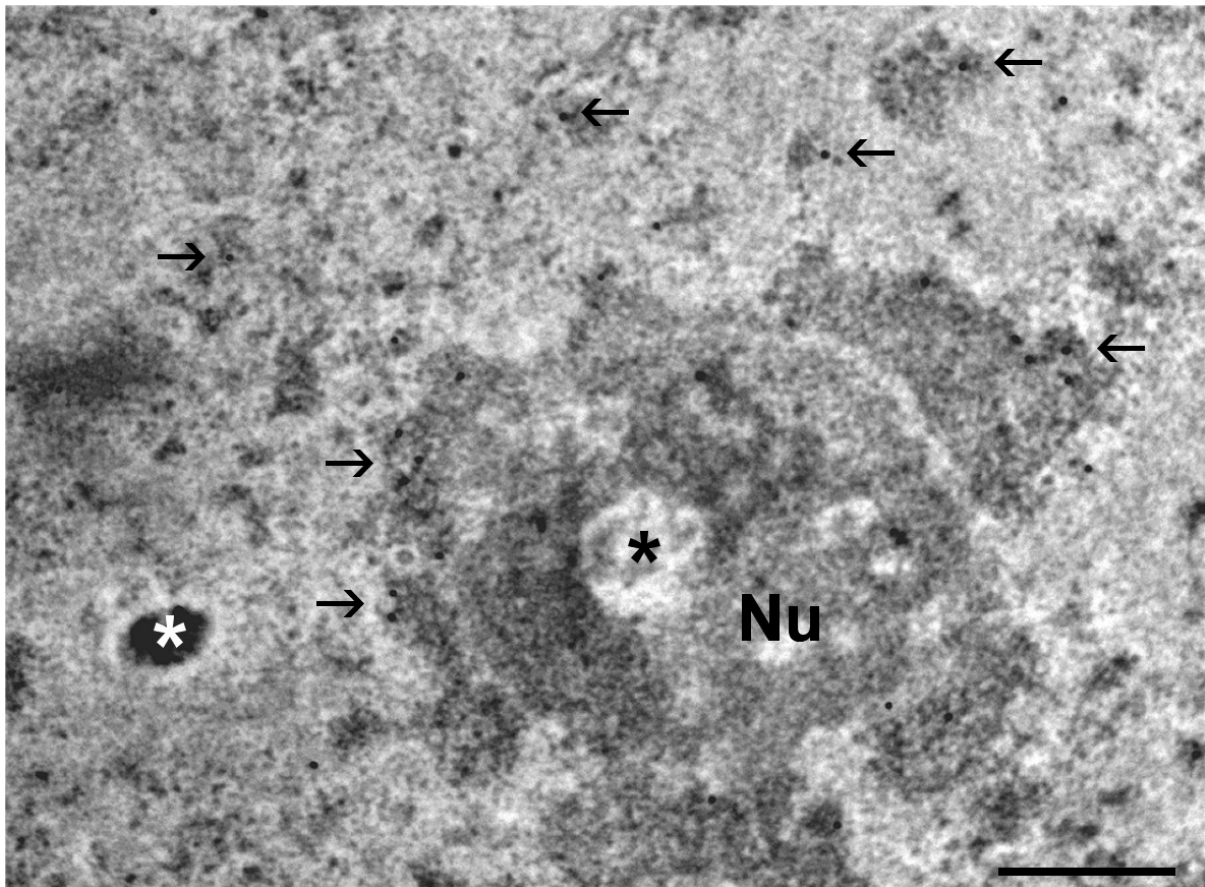


Fig. 13. Nucleo di epatocita di moscardino ibernante, anticorpo anti-ACSL-1. La marcatura è localizzata nella regione pericromatinica, in prossimità delle fibrille pericromatiniche (frecce), mentre risulta meno abbondante nel nucleolo (Nu). Non mostrano marcatura né l'amorphous body (asterisco bianco) né il coiled body (asterisco nero), corpi nucleari tipici dello stato ibernante. Barra= 0,5 μ m.

Discussione e Conclusioni

In questa tesi è stata studiata la distribuzione subcellulare di due enzimi chiave del metabolismo lipidico negli epatociti di moscardini eutermici, ibernanti e in risveglio. In particolare, sono stati studiati l'enzima Acido Grasso Sintetasi (FAS), che catalizza tutte le reazioni del processo biosintetico fino alla formazione dell'acido palmitico, e l'Acil CoA sintetasi (ACSL-1), che catalizza l'attivazione degli acidi grassi a lunga catena a tioesteri del CoA, che rappresenta la prima tappa per la successiva metabolizzazione degli acidi grassi nella cellula (Lehninger, 1987).

La novità di questo lavoro di ricerca è consistita, innanzitutto, nella messa a punto di un protocollo di immunocitochimica per la rivelazione ultrastrutturale di questi due enzimi. Il trasferimento alla microscopia elettronica di una metodica di immunoistochimica messa a punto per la microscopia ottica non è né automatico né scontato e necessita di alcuni adattamenti metodologici e della individuazione ex-novo delle condizioni ottimali per l'ottenimento di risultati attendibili e riproducibili (Bozzola and Russel, 1999).

In primo luogo, la scelta del fissativo deve rispettare due criteri fondamentali: la conservazione di un sufficiente dettaglio ultrastrutturale associata alla conservazione delle proprietà antigeniche delle molecole tissutali (Hayat, 2000). Nel nostro caso la fissazione con 4% paraformaldeide in tampone fosfato si è dimostrata adeguata nel soddisfare entrambi i requisiti. In secondo luogo, l'inclusione in resine parzialmente idrofiliche permette la parziale penetrazione di molecole d'acqua che contengono substrati e anticorpi e questo è uno dei requisiti indispensabili perché abbia luogo la reazione tra l'antigene tissutale e l'anticorpo primario. Nel nostro protocollo l'uso della resina Lowicryl K₄M, che prevede la disidratazione del campione a bassa temperatura e che polimerizza a basse temperature sotto raggi UV, si è dimostrata adeguata per preservare l'antigenicità del campione.

Gli anticorpi disponibili in commercio e usati in questo studio non erano mai stati testati per l'immunocitochimica ultrastrutturale e, quindi le condizioni sperimentali utili per una buona marcatura erano ignote. È stato infatti necessario effettuare diversi test immunocitochimici a concentrazioni diverse di anticorpi primari e secondari nonché di pH e di condizioni di bloccaggio dei siti aspecifici (aldeidi libere e siti aspecifici di legame degli anticorpi), per ottenere un protocollo specifico e riproducibile.

Il protocollo messo a punto è caratterizzato da concentrazioni degli anticorpi primari tra 1:2 e 1:10 e dei secondari a 1:20, quindi concentrazioni molto più elevate rispetto a quelle normalmente utilizzate per l'immunoistochimica in microscopia ottica. Si tratta tuttavia di un risultato atteso, dovuto al ridotto numero di antigeni disponibili al legame con l'anticorpo, limitati in microscopia elettronica alla sola superficie della sezione per una profondità di pochi nanometri.

Una volta messo a punto, il protocollo è stato applicato per valutare la distribuzione dell'immunomarcatura dei due enzimi considerati in diversi compartimenti cellulari di moscardini in eutermia, cioè nelle condizioni fisiologiche di riferimento.

La marcatura per il FAS è stata osservata quasi esclusivamente nel citoplasma delle cellule eutermiche associata in particolare alle vescicole del reticolo endoplasmatico liscio, mentre sono risultati quasi completamente negativi nucleo e mitocondri. La distribuzione osservata conferma quanto atteso in considerazione della funzione di questo enzima che è quella di catalizzare la sintesi degli acidi grassi, la quale, come è noto, avviene nelle cisterne del reticolo endoplasmatico liscio (Lehninger, 1987).

La marcatura dell'ACLS-1 negli epatociti dei moscardini eutermici è stata osservata nel citoplasma, prevalentemente associata alle vescicole del reticolo endoplasmatico liscio e in parte diffusa nel citosol. Anche per questo enzima la localizzazione citoplasmatica ha confermato quanto atteso in base alle modalità di attivazione degli acidi grassi. Nel nucleo i grani di oro colloidale sono associati alle fibrille pericromatiniche, sito di trascrizione e splicing del pre-mRNA e in piccola misura al nucleolo. In letteratura questo dato è confermato da Losada (Ves-Losada and Brenner, 1996) che ha riportato la presenza di questo enzima nel nucleo di epatociti di ratto tramite metodiche biochimiche. Nei mitocondri la marcatura di questo enzima è distribuita sulle membrane mitocondriali e nella matrice. Questo risultato conferma quanto descritto in letteratura in base a studi biochimici (Kusakabe et al., 2000).

In un'ulteriore tappa del lavoro, l'immunolocalizzazione degli enzimi FAS e ACLS-1 è stata effettuata in fegati di moscardino prelevati in altre due fasi del ciclo annuale, ibernazione e risveglio primaverile, e i risultati confrontati con quella ottenuta sui moscardini eutermici. I risultati forniscono nuove informazioni relative alla distribuzione intracellulare dei due enzimi considerati e alle loro variazioni nel corso del ciclo annuale.

FAS

Abbiamo evidenziato un drastico calo dell'immunomarcatura per il FAS nel compartimento citoplasmatico durante la fase di ibernazione. Questa osservazione può essere spiegata dal fatto che durante l'ibernazione il bilancio tra sintesi e degradazione degli acidi grassi subisce un consistente shift a favore della degradazione, che diventa la fonte quasi esclusiva di energia per il mantenimento del ridotto metabolismo di base (John, 2005). I nostri dati sono confermati da studi biochimici condotti su roditori ibernanti come la marmotta (Mostafa et al., 1993) e lo scoiattolo (Wang et al., 1997), che hanno evidenziato un considerevole calo dell'attività del FAS durante la fase di ibernazione. Perché vengano ripristinati i livelli normali di enzima bisogna aspettare la piena fase di eutermia: infatti durante la fase di risveglio (corrispondente, nei nostri animali, ad una temperatura corporea di 26°C) la marcatura aumenta ma si mantiene a livelli inferiori rispetto a quelli osservati durante l'eutermia in tutti gli animali considerati. Queste osservazioni sono in accordo con dati della letteratura che dimostrano che nella primissima fase di risveglio i carboidrati rappresentano il principale combustibile per l'ossidazione cellulare (Mokrasch et al., 1960), ma, successivamente, il completamento della fase di risveglio è sostenuta dall'ossidazione dei lipidi (John, 2005). Si può ipotizzare che la scarsa disponibilità di substrati durante il risveglio non permetta il pieno ripristino della via di sintesi dei lipidi. La marcatura dei nuclei è trascurabile, senza significative variazioni nelle diverse fasi del ciclo annuale. Si tratta di un risultato atteso in quanto la FAS è un enzima eminentemente citoplasmatico (Lehninger, 1987).

Anche nei mitocondri la marcatura in eutermia e ibernazione risulta trascurabile; tuttavia, nella fase di risveglio esso aumenta significativamente. La presenza nei mitocondri di enzimi responsabili della sintesi di acidi grassi è comune sia nei Procarioti che nelle piante, mentre la possibilità che enzimi mitocondriali FAS-simili esistano negli animali è ancora in discussione, anche se alcuni autori ne hanno identificato due componenti nei mitocondri umani (Zhang et al., 2003). Sebbene il significato della presenza di significative quantità di marcatura anti-FAS all'interno dei mitocondri di epatociti di moscardini in fase risveglio rimanga sconosciuto, i dati in letteratura inducono a non escludere a priori la possibilità che subunità o componenti del complesso enzimatico Fas che reagiscono con l'anticorpo da noi usato siano sovraesprese nei mitocondri in una fase di forte richiesta energetica quale il risveglio dall'ibernazione. Ulteriori studi saranno dedicati alla comprensione di questo inaspettato ed interessante risultato.

ACSL-1

La principale fonte energetica durante l'ibernazione è costituita dai lipidi, accumulati nel tessuto adiposo bianco durante l'estate e l'autunno. Tuttavia, i lipidi vengono anche accumulati in altri tessuti, probabilmente a causa della necessità dei mitocondri di usufruire di una riserva di acidi grassi in situ per mantenere le loro funzioni. Un rilevante aumento della quantità di gocce lipidiche avviene nel tessuto adiposo bruno, dove gli acidi grassi sono necessari per le funzioni termogeniche del tessuto (Horwitz et al., 1985), ma anche nel fegato, dove si assiste ad un notevole incremento di gocce lipidiche in autunno e ad una progressiva diminuzione durante il periodo ibernante fino al risveglio, quando gli epatociti ne risultano praticamente privi (Malatesta et al., 2002).

In questo lavoro abbiamo evidenziato un significativo aumento della marcatura dell'ACSL-1 citoplasmatico durante l'ibernazione. Questo enzima che attiva gli acidi grassi destinati alla β -ossidazione mitocondriale risulta fondamentale nella sua funzione di iniziare il processo di ossidazione degli acidi grassi per la produzione di energia per le funzioni cellulari mantenute ad un livello minimo per la sopravvivenza durante il periodo ipometabolico. Il risultato era parzialmente prevedibile proprio perché l'ACSL-1 è prevalentemente associato al reticolo endoplasmatico liscio (Miyazawa et al., 1985) che, durante l'ibernazione, subisce un incremento in molti tessuti (fegato, pancreas, corteccia surrenale, rene) (Zancanaro et al., 1997; Zancanaro et al., 1999; Malatesta et al., 1998; Malatesta et al., 2001; Malatesta et al., 2002), probabilmente a causa dell'aumentato metabolismo lipidico.

Durante il risveglio i valori di marcatura diminuiscono significativamente nel citoplasma pur mantenendosi al di sopra dei livelli eutermici. Una spiegazione possibile di questa riduzione è che, come è stato menzionato prima, l'ossidazione degli acidi grassi sostiene in maniera significativa la fase di risveglio, ma anche l'ossidazione dei carboidrati ricomincia a contribuire nella produzione di energia.

L'immunomarcatura nel nucleo dei moscardini ibernanti ha evidenziato un significativo aumento di ACSL-1 che si mantiene anche in fase di risveglio. In letteratura ci sono evidenze della presenza di ACSL-1 nel nucleo di cellule epatiche di ratto (Ves-Losada and Brenner, 1996) dove avrebbe una funzione regolatoria modulando l'espressione genica (Black et al., 2000). Ad esempio gli acidi grassi attivati sono i ligandi endogeni di alcuni fattori di trascrizione (Hertz et al., 1998; DiRusso et al., 1998). Sarà necessario approfondire con studi ulteriori l'esatto significato dell'aumento della marcatura dell'ACSL-1 che abbiamo osservato

nel nucleo dei moscardini ibernanti. Si può ipotizzare un suo maggiore coinvolgimento nella regolazione di geni che determinano le profonde modificazioni metaboliche messe in atto durante l'ibernazione. È stato dimostrato ad esempio che gli acidi grassi attivati, prodotti dall'ACSL-1, influenzano la regolazione nucleare dell'induzione di enzimi lipogenici (Kusakabe et al., 2000).

In conclusione, l'applicazione del protocollo di immunocitochimica ultrastrutturale, messo a punto in questo lavoro, fornisce nuove informazioni sulla localizzazione intracellulare degli enzimi FAS e ACSL-1 coinvolti nel metabolismo lipidico. I nostri dati sono confermati da dati biochimici e di microscopia ottica presenti in letteratura. Estendendo poi lo studio alle diverse fasi del ciclo annuale del moscardino, è stato possibile evidenziare cambiamenti significativi dell'espressione dei due enzimi correlati alle differenti fasi del ciclo annuale, in accordo con le profonde modificazioni che il metabolismo lipidico subisce per adattarsi alle condizioni ambientali avverse.

Infine, la messa a punto di questo protocollo riveste un'importanza che va oltre lo studio dei cambiamenti metabolici che si verificano nel ciclo eutermia-ibernazione-risveglio. L'immunocitochimica ultrastrutturale, infatti, permette lo studio di campioni di tessuto di piccolissime dimensioni, al di sotto del mm^3 , risultando così applicabile a campioni molto piccoli, quali ad esempio le biopsie epatiche umane, dove spesso l'immunoistochimica in microscopia ottica di routine non è applicabile proprio per la scarsità del materiale biologico prelevato, offrendo quindi la possibilità di approfondire eventuali cambiamenti o alterazioni nell'espressione degli enzimi del metabolismo epatico in patologia umana.

References

1. Black, P.N., N.J.Fargeman, and C.C.DiRusso. 2000. Long-Chain Acyl-CoA-Dependent Regulation of Gene Expression in Bacteria, Yeast and Mammals. *J. Nutr.* 130:305.
2. Boswell, T., R.D.Richardson, M.W.Schwartz, D.A.D'Alessio, S.C.Woods, A.J.Sipols, D.G.Baskin, and G.J.Kenagy. 1993. NPY and galanin in a hibernator: Hypothalamic gene expression and effects on feeding. *Brain Research Bulletin* 32:379-384.
3. Bozzola, J. and L.Russel. 1999. Electron Microscopy. Sudbury.
4. Bronnikov, G.E., S.O.Vinogradova, and B.V.Chernyak. 1990. Regulation of ATP hydrolysis in liver mitochondria from ground squirrel. *FEBS Letters* 266:83-86.
5. Brooks, S.P.J. and K.B.Storey. 1992. Mechanisms of glycolytic control during hibernation in the ground squirrel *Spermophilus lateralis*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 162:23-28.
6. Brustovetsky, N.N., M.V.Egorova, and D.Y.Gnutov. 1993a. The mechanism of calcium-dependent activation of respiration of liver mitochondria from hibernating ground squirrels, *Citellus undulatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 106:423-426.
7. Brustovetsky, N.N., M.V.Egorova, E.N.Iljasova, and L.E.Bakeeva. 1993b. Relationship between structure and function of liver mitochondria from hibernating and active

- ground squirrels, *Citellus undulatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 106:125-130.
8. Buck, C.L. and B.M.Barnes. 2000. Effects of ambient temperature on metabolic rate, respiratory quotient, and torpor in an arctic hibernator. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R255-R262.
 9. Buck, MJ., TL.Squire, and MT.Andrews. 2002. Coordinate expression of the PDK4 gene: a means of regulating fuel selection in a hibernating mammal. *Physiol. Genomics* 8:5-13.
 10. Burlington, R. and G.Klain. 1967. Gluconeogenesis during hibernation and arousal from hibernation. *Comp. Biochem. Physiol.* 22:701-708.
 11. Carey, H., M.Andrews, and S.Martin. 2003. Mammalian Hibernation: Cellular and Molecular Responses to Depressed Metabolism and Low Temperature. *Physiol. Rev.* 83:1153-1181.
 12. Castex, C., A.Tahri, R.Hoo-Paris, and B.C.Sutter. 1984. Insulin secretion in the hibernating edible dormouse (*Glis glis*): In vivo and in vitro studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 79:179-183.
 13. DiRusso, C.C., V.Tsvetnitsky, P.Hojrup, and J.Knudsen. 1998. Fatty Acyl-CoA Binding Domain of the Transcription Factor FadR. characterization by deletion, affinity labeling, and isothermal titration calorimetry. *J. Biol. Chem.* 273:33652-33659.

14. Duplus, E. and C.Forest. 2002. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochemical Pharmacology* 64:893-901.
15. Florant, G.L., R.Hoo-Paris, C.Castex, W.A.Bauman, and B.C.Sutter. 1986. Pancreatic A and B cell stimulation in euthermic and hibernating marmots (*Marmota flaviventris*): effects of glucose and arginine administration. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 156:309-314.
16. French, A. 1985. Allometries of the durations of torpid and euthermic intervals during mammalian hibernation: A test of the theory of metabolic control of the timing of changes in body temperature. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 156:13-19.
17. French, A. 1988. The patterns of mammalian hibernation. *Am Sci* 76:569-575.
18. Geiser, F. 2004. Metabolic Rate and Body Temperature Reduction During Hibernation and Daily Torpor. *Annual Review of Physiology* 66:239-274.
19. Halestrap, A.P. 1987. The regulation of the oxidation of fatty acids and other substrates in rat heart mitochondria by changes in the matrix volume induced by osmotic strength, valinomycin and Ca^{2+} . *Biochem. J.* 244:159-164.
20. Halestrap, A.P. and J.L.Dunlop. 1986. Intramitochondrial regulation of fatty acid beta-oxidation occurs between flavoprotein and ubiquinone. A role for changes in the matrix volume. *Biochem. J.* 239:559-565.

21. Hayat, M. 2000. Principles and Thecniques of Electron Microscopy. Biological Application. Cambridge University Press.
22. Heldmaier, G., S.Steinlechner, T.Ruf, H.Wiesinger, and M.Klingenspor. 1989. Photoperiod and thermoregulation in vertebrates: body temperature rhythms and thermogenic acclimation. *J. Biol. Rhytms* 4:251-265.
23. Hertz, R., J.Magenheim, I.Berman, and J.Bar-Tana. 1998. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4[alpha]. *Nature* 392:512-516.
24. Hittel, D. and K.B.Storey. 2002a. The translation state of differentially expressed mRNAs in the hibernating 13-lined ground squirrel (*Spermophilus tridecemlineatus*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 401:244-254.
25. Hittel, D.S. and K.B.Storey. 2002b. Differential expression of mitochondria-encoded genes in a hibernating mammal. *J Exp Biol* 205:1625-1631.
26. Horwitz, B.A., J.S.Hamilton, and K.S.Kott. 1985. GDP binding to hamster brown fat mitochondria is reduced during hibernation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 249:R689-R693.
27. Jacob, W., A.Bakker, R.Hertsens, and W.Biermans. 1994. Mitochondrial matrix granules: Their behavior during changing metabolic situations and their relationship to contact sites between inner and outer mitochondrial membranes. *Microscopy Research and Technique* 27:307-318.

28. John, D. 2005. Annual lipid cycles in hibernators: Integration of Physiology and Behavior. *Annual Review of Nutrition* 25:469-497.
29. Kabine, M., M.C.Clemencet, J.Bride, M.S.E.Kebbaj, N.Latruffe, and M.Cherkaoui-Malki. 2003. Changes of peroxisomal fatty acid metabolism during cold acclimatization in hibernating jerboa (*Jaculus orientalis*). *Biochimie* 85:707-714.
30. Kolaeva, S., R.Kramarova, E.Ilyasova, and F.Ilyasova. 1980. The kinetic and metabolism of the cells of hibernating animals during hibernation. *Int. Rev. Cytol* 66:148-169.
31. Kortner, G. and F.Geiser. 2000. The temporal organization of daily torpor and hibernation: circadian and circannual rhythms. *Chronobiol. Int.* 17:103-109.
32. Krilowicz, B.L. 1985. Ketone body metabolism in a ground squirrel during hibernation and fasting. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 249:R462-R470.
33. Kusakabe, T., M.Maeda, N.Hoshi, T.Sugino, K.Watanabe, T.Fukuda, and T.Suzuki. 2000. Fatty Acid Synthase Is Expressed Mainly in Adult Hormone-sensitive Cells or Cells with High Lipid Metabolism and in Proliferating Fetal Cells. *J. Histochem. Cytochem.* 48:613-622.
34. Lehninger, A. 1987. Biochimica. Zanichelli.

35. Li, L.O., D.G.Mashek, J.An, S.D.Doughman, C.B.Newgard, and R.A.Coleman. 2006. Overexpression of Rat Long Chain Acyl-CoA Synthetase 1 Alters Fatty Acid Metabolism in Rat Primary Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 281:37246-37255.

36. Liu, X., Q.Li, Q.Lin, and R.Sun. 2001. Uncoupling protein1 mRNA, mitochondrial GTP-binding, and T4 5'-deiodinase of brown adipose tissue in euthermic Daurian ground squirrel during cold exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 128:827-835.

37. Malatesta , M., B.Baldelli, L.Rossi, S.Serafini, and G.Gazzanelli. 2003. Fine distribution of CLOCK protein in hepatocytes of hibernating dormice. *European Journal of Histochemistry* 47:233-240.

38. Malatesta , M., A.Cardinali, S.Battistelli, C.Zancanaro, T.Martin, S.Fakan, and G.Gazzanelli. 1999. Nuclear bodies are usual constituents in tissues of hibernating dormice. *The Anatomical Record* 254:389-395.

39. Malatesta , M., G.Gazzanelli, F.Marcheggiani, C.Zancanaro, and M.B.L.Rocchi. 2001. Ultrastructural characterisation of periinsular pancreatic acinar cells in the hibernating dorouse Moscarinus avellanarius. *Italian Journal of Zoology* 68:101-106.

40. Malatesta, M., C.Zancanaro, T.Martin, E.Chan, F.Amalric, R.Luhrmann, P.Vogel, and S.Fakan. 1994. Cytochemical and immunocytochemical characterization of nuclear bodies during hibernation. *Eur. J. Cell. Biol.* 65:82-93.

41. Malatesta, M., S.Battistelli, M.B.L.Rocchi, C.Zancanaro, S.Fakan, and G.Gazzanelli. 2001. Fine structural modification of liver, pancreas and brown adipose tissue mitochondria from hibernating, arousing and euthemic dormice. *Cell Biology International* 25:131-138.
42. Malatesta, M., C.Zancanaro, B.Baldelli, and G.Gazzanelli. 2002. Quantitative ultrastructural changes of hepatocyte constituents in euthermic, hibernating and arousing dormice (*Muscardinus avellanarius*). *Tissue and Cell* 34:397-405.
43. Malatesta, M., C.Zancanaro, F.Marcheggiani, A.Cardinali, M.B.L.Rocchi, D.Capizzi, P.Vogel, S.Fakan, and G.Gazzanelli. 1998. Ultrastructural, morphometrical and immunocytochemical analyses of the exocrine pancreas in a hibernating dormouse. *Cell and Tissue Research* 292:531-541.
44. Malatesta, M., C.Zancanaro, M.Tamburini, T.E.Martin, X.D.Fu, P.Vogel, and S.Fakan. 1995. Novel nuclear ribonucleoprotein structural components in the dormouse adrenal cortex during hibernation. *Chromosoma* 104:121-128.
45. Mashek, D.G., K.E.Bornfeldt, R.A.Coleman, J.Berger, D.A.Bernlohr, P.Black, C.C.DiRusso, S.A.Farber, W.Guo, N.Hashimoto, V.Khodiyar, F.A.Kuypers, L.J.Maltais, D.W.Nebert, A.Renieri, J.E.Schaffer, A.Stahl, P.A.Watkins, V.Vasiliou, and T.T.Yamamoto. 2004. Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family. *J. Lipid Res.* 45:1958-1961.
46. Mayhew, T. 2007. Quantitative Immunoelectron Microscopy. *In* Electron Microscopy, Methods and Protocols. J.Kuo, editor. Humana Press, 309-330.

47. Miyazawa, S., T.Hashimoto, and S.Yokota. 1985. Identity of Long-Chain Acyl-Coenzyme A Synthetase of Microsomes, Mitochondria, and Peroxisomes in Rat Liver. *J Biochem* 98:723-733.
48. Mokrasch, L.C., H.J.Grady, and S.Grisolia. 1960. Thermogenic and adaptive mechanisms in hibernation and arousal from hibernation. *Am J Physiol* 199:945-949.
49. Mostafa, N., D.C.Everett, S.C.Chou, P.A.Kong, G.L.Florant, and R.A.Coleman. 1993. Seasonal changes in critical enzymes of lipogenesis and triacylglycerol synthesis in the marmot (*Marmota flaviventris*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 163:463-469.
50. Nizielski, S.E., C.J.Billington, and A.S.Levine. 1989. Brown fat GDP binding and circulating metabolites during hibernation and arousal. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 257:R536-R541.
51. Rousseau, K., Z.Atcha, and A.S.I.Loudon. 2003. Leptin and Seasonal Mammals. *Journal of Neuroendocrinology* 15:409-414.
52. Smith, S. 1994. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* 8:1248-1259.
53. Strijkstra, A.M. and S.Daan. 1997. Ambient temperature during torpor affects NREM sleep EEG during arousal episodes in hibernating European ground squirrels. *Neuroscience Letters* 221:177-180.

54. Sul, H.S. and D.Wang. 1998. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: Studies of Fatty Acid Synthase and Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Gene Transcription. *Annual Review of Nutrition* 18:331-351.
55. Suzuki, H., Y.Kawarabayasi, J.Kondo, T.Abe, K.Nishikawa, S.Kimura, T.Hashimoto, and T.Yamamoto. 1990. Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* 265:8681-8685.
56. Tamburini, M., M.Malatesta, C.Zancanaro, T.Martin, X.D.Fu, P.Vogel, and S.Fakan. 1996. Dense granular bodies: a novel nucleoplasmic structure in hibernating dormice. *Histochemistry and Cell Biology* 106:581-586.
57. Van Breukelen, F. and S.Martin. 2002. Reversible depression of transcription during hibernation. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 172:355-361.
58. Ves-Losada, A. and R.R.Brenner. 1996. Long-chain fatty Acyl-CoA synthetase enzymatic activity in rat liver cell nuclei. *Molecular and Cellular Biochemistry* 159:1-6.
59. Wakil, S.J. 1989. Fatty acid synthase, a proficient multifactorial enzyme. *American Chemical Society* 28:4523-4530.
60. Wang, P., R.D.Walter, B.G.Bhat, G.L.Florant, and R.A.Coleman. 1997. Seasonal Changes in Enzymes of Lipogenesis and Triacylglycerol Synthesis in the Golden-

Mantled Ground Squirrel (*Spermophilus lateralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 118:261-267.

61. Whitten, B.K. and G.J.Klain. 1968. Protein metabolism in hepatic tissue of hibernating and arousing ground squirrels. *Am J Physiol* 214:1360-1362.
62. Zancanaro, C., M.Malatesta, F.Merigo, D.Benati, S.Fakan, and G.Gazzanelli. 2000. Ultrastructure of organs and tissues of dormice during hibernation. *In* Life in the cold. Springer, editor. Berlin. 269-276.
63. Zancanaro, C., M.Malatesta, P.Vogel, F.Osculati, and S.Fakan. 1997. Ultrastructure of the adrenal cortex of hibernating, arousing and euthermic dormouse, *Muscardinu avellanarius*. *Anat. Rec.* 249:359-364.
64. Zancanaro, C., M.Malatesta, P.Vogel, F.Osculati, and S.Fakan. 1993. Ultrastructural and morphometrical analyses of the brown adipocyte nucleus in a hibernating dormouse. *Biol. Cell* 79:55-61.
65. Zancanaro, C., M.Malatesta, F.Mannello, P.Vogel, and S.Fakan. 1999. The kidney during hibernation and arousal from hibernation. A natural model of organ preservation during cold ischaemia and reperfusion. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14:1982-1990.
66. Zhang, L., A.K.Joshi, and S.Smith. 2003. Cloning, Expression, Characterization, and Interaction of Two Components of a Human Mitochondrial Fatty Acid Synthase: malonyltransferase and acyl carrier protein. *J. Biol. Chem.* 278:40067-40074.

